



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN



MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par :

M^{elle} SAHOULI Amina

Sur le thème

Formulation de shampooings à base de clou de girofle

Soutenu publiquement le **31 Mai 2023** à Tlemcen devant le jury composé de :

| | | | |
|-----------------------|-------------|-----------------------|---------------|
| Mr BENSALD Okkacha | Professeur | Université de Tlemcen | Président |
| Mr ALLALI Hocine | Professeur | Université de Tlemcen | Examineur |
| Mme BENSMAIN Amal | Professeure | Université de Tlemcen | Encadrante |
| Mme GUENDOUCZ Souhila | Docteur | Université de Tlemcen | Co-encadrante |

Année Universitaire : 2022 ~ 2023

DEDICACE

*Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience,
la volonté et de m'avoir fourni sa bénédiction.*

Je dédie ce modeste travail

*Aux êtres les plus chers au monde mon père et ma mère pour leurs encouragement, tendresse,
amour et soutien durant mes études*

À mon cher oncle Ahmed

À mes chers frères Boumediene et Mohamed

À ma nièce Imene et son frère Ayoub, que Dieu les protèges

À mes chères amies : Fatima Zahra; Souhila et Sabrina.

À mes amis de promotion de master Chimie des Produits Naturelles

À tous ceux qui m'ont aidée et encouragée durant mes années d'études.

Amina SAHOULI

REMERCIEMENT

En premier lieu, je remercie "الله" tout puissant pour nous avoir éclairé les chemins du savoir et de la sagesse et nous avoir permis de mener à bout ce travail.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) ainsi que le laboratoire TOXICOMED de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen dont je remercie infiniment leurs directeurs respectifs Prof GHALEM Saïd et Prof SEKKAL Samira pour leur accueil.

Je tiens, d'abord, à remercier infiniment Prof. BENSMAIN Amal, mon encadrant, pour ses encouragements, son soutien moral et ses conseils tout au long de mon travail de stage de Master et aussi pour sa disponibilité.

Je remercie également Dr GUENDOUCZ Souhila et Prof. CHOUKCHOU BRAHAM Esma pour leurs conseils et aide à réaliser ce travail.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury : le Président du jury Prof. BENSALD Okkacha et Prof. ALLALI Hocine, l'examineur, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions et corrections du manuscrit.

Je remercie Madame MEHIAOUI Kheira et Monsieur BENMENSOUR Boumediene ingénieurs du laboratoire LASNABIO et Monsieur TALEB Zohir ingénieur du laboratoire TOXICOMED pour leur aide et disponibilité tout au long de mon stage.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Dr BENHMIDET Lyna et Dr SAIBI Amina pour l'attention et l'aide qu'elles m'ont apportée sans oublier aussi Dr BELKHODJA Majid.

Je tiens à remercier également mon oncle SAHOULI Ahmed pour son soutien et aide. Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères amies : Fatima Zohra, Souhila et Sabrina.

Je voudrais aussi remercier les enseignants qui ont assurés ma formation de master, aussi l'ensemble de mes collègues, des plus anciens aux plus récents ainsi que toutes les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire, pour leur aide, leur soutien, leur bonne humeur et leur gentillesse.

MERCI

LISTE DES ABREVIATIONS

AA& : Acide ascorbique.

Ac : Acide citrique

DPPH : 2, 2-Diphényl-1-PicrylHydrazyle.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant power.

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

TCA : Acide trichloroacétique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

SLS : Lauryl sulfate de sodium.

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 01 : PARTIE BIBLIOGRAPHIE

Tableau 1-1 : Classification botanique giroflier (Goetz et al, 2012) 6

Tableau 1-2 : Formule générale d'un shampoing liquide (Bounjoua et al, 2014)12

CHAPITRE 02 : PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 2-1 : Réactifs, verreries et matériels utilisés 15

Tableau 2-2 : Germes test de référence utilisés 25

Tableau 2-3 : Formulations des shampoings à base d'huile essentielle de clou de girofle...27

Tableau 2-4 : Formulations des shampoings à base d'extrait de clou de girofle28

CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 3-1 : Rendement de l'huile essentielle33

Tableau 3-2 : Caractéristiques organoleptiques de produits d'extraction de clou de girofle ..33

Tableau 3-3 : Résultats de la méthode DPPH.....35

Tableau 3-4 : Diamètres des zones d'inhibition en mm..... 38

Tableau 3-5: Résultats des tests phytochimique39

Tableau 3-6: Formulations de shampoings40

Tableau 3-7 : Analyse organoleptique des shampoings formulés.....41

Tableau 3-8 : pH des formulations des shampoings41

Tableau 3-9: Pouvoir antioxydant des shampoings déterminé par la méthode DPPH42

LISTE DES FIGURES

Chapitre 01 : PARTIE BIBLIOGRAPHIE

| | |
|---|---|
| Fig. 1.1: Clou de girofle | 6 |
| Fig. 1.2: Clou rose récolté avant l'épanouissement de la fleur (Barbelet et al. 2015)..... | 7 |
| Fig. 1.3: Structures principaux des constituants d'huile de <i>S. aromaticum</i> | 8 |

Chapitre 02 : PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|---|----|
| Fig. 2.1 : Clou de girofle entier, après broyage..... | 14 |
| Fig. 2.2 : Diagramme du protocole expérimental de l'étude formulation de shampooing à base de clou de girofle | 16 |
| Fig. 2.3 : Extraction par macération dans un mélange de solvants | 17 |
| Fig. 2.4 : filtration du mélange après 24h | 17 |
| Fig. 2.5 : Extrait sec de la macération de clou de girofle dans le mélange de solvants de solvants..... | 17 |
| Fig. 2.6 : Extraction par infusion dans l'eau | 18 |
| Fig. 2.7 : Extrait sec par infusion dans l'eau..... | 18 |
| Fig. 2.8 : Extraction par macération dans le méthanol..... | 19 |
| Fig. 2.9 : Extrait sec par méthanol | 19 |
| Fig. 2.10 : Extraction de l'huile essentielle du clou de girofle par Hydrodistillation | 20 |
| Fig. 2.11: récupération de l'hydrolat | 20 |
| Fig. 2.12: Récupération de l'huile essentielle et l'hydrolat | 21 |
| Fig. 2.13 : Réduction du radical DPPH du violet au jaune | 22 |
| Fig. 2.14 : % d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique..... | 23 |
| Fig. 2.15 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de clou girofle dans le mélange de solvants | 23 |
| Fig. 2.16: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux | 23 |

| | |
|--|----|
| Fig. 2.17 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique | 23 |
| Fig. 2.18: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle | 23 |
| Fig. 2.19: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'hydrolat..... | 23 |
| Fig. 2.20 : Réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} du jaune au vert (frappe) | 24 |
| Fig. 2.21 : La bactérie et la levure | 26 |
| Fig. 2.22 : Réduction du radical DPPH du violet au jaune pour dix shampooings..... | 29 |
| Fig. 2-23 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de témoin | 30 |
| Fig. 2-24 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de H1 | 30 |
| Fig. 2-25 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de H2 | 30 |
| Fig. 2-26 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de H3... .. | 30 |
| Fig. 2-27 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F1 | 30 |
| Fig. 2-28 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F2 | 30 |
| Fig. 2-29 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F3 | 31 |
| Fig. 2-30 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F4..... | 31 |
| Fig. 2-31 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F5..... | 31 |
| Fig. 2-32 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F6..... | 31 |
| Fig. 2.33 : Réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} du jaune au vert (frappe) pour dix shampooings..... | 32 |

CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

| | |
|---|----|
| Fig.3-1 : CI_{50} des extraits et l'huile essentielle et l'hydrolat déterminées par la méthode DPPH..... | 35 |
| Fig. 3-2 : Courbes d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP..... | 36 |
| Fig.3-3 : Activité antibactériennes des différents extraits de clou de girofle sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 | 37 |

| | |
|--|----|
| Fig. 3-4 : Activité antimicrobienne de différentes substances extraites de clou de girofle sur <i>Candida albicans</i> ATCC 10231..... | 38 |
| Fig. 3-5 : Aspect des shampoings à base d'huile essentielle et des extraits de girofle T, H1, H2, H3, F1, F2, F3, F4, F5, F6 (de gauche à droite) | 40 |
| Fig. 3-6 : CI_{50} des shampoings | 43 |
| Fig. 3-7 : Courbes d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP pour les shampoings..... | 44 |

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| CHAPITRE 01 : PARTIE BIBLIOGRAPHIE | 4 |
| 1. Généralité sur le Clou de girofle..... | 5 |
| 1.1. Introduction..... | 5 |
| 1.2. Description de la plante | 5 |
| 1.2.1. Définition | 5 |
| 1.2.2. Origine du nom..... | 6 |
| 1.2.3. La culture du giroflier | 7 |
| 1.2.4. Composition chimique de <i>Syzygium aromaticum</i> | 7 |
| 1.3. Les techniques d'extraction | 8 |
| 1.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques | 9 |
| 2. Généralités sur le shampoing..... | 10 |
| 2.1. Définition d'un shampoing | 10 |
| 2.2. Qualités requises d'un Shampoing | 10 |
| 2.3. Composition d'un Shampoing | 11 |
| 2.3.1. Eau..... | 11 |
| 2.3.2. Tensioactifs | 11 |
| 2.3.3. Agents épaississants | 11 |
| 2.3.4. Agents conditionneurs | 11 |
| 2.3.5. Agents moussants | 12 |
| 2.3.6. Parfums..... | 12 |
| 2.3.7. Colorants | 12 |
| 2.4. Formule générale des shampoings..... | 12 |
| CHAPITRE02: PARTIE EXPERIMENTALE..... | 13 |
| 1. Introduction | 14 |
| 2. Matériel et produits utilisés..... | 14 |
| 2.1. Matériel végétal | 14 |
| 2.2. Matériel du laboratoire | 14 |
| 3. Protocole expérimental | 15 |
| 3.1. Méthode d'extraction..... | 16 |
| 3.1.1. Extraction par macération dans un mélange de solvants..... | 16 |
| 3.1.2. Extraction par infusion dans l'eau..... | 17 |

| | | |
|--------|---|-----------|
| 3.1.3. | Extraction par macération dans le méthanol | 18 |
| 3.2. | Extraction de l'huile essentielle de clou de girofle..... | 19 |
| 3.2.1. | Procédé d'hydrodistillation | 19 |
| 3.2.2. | Mode opératoire | 19 |
| 3.3. | Rendement..... | 21 |
| 3.4. | Les activités antioxydants des extraits et huile essentielle de clou de girofle | 21 |
| 3.4.1. | Méthode de réduction du radical libre DPPH | 21 |
| 3.4.2. | Méthode de la réduction du fer FRAP | 24 |
| 3.5. | Activité antimicrobienne | 24 |
| 3.6. | Les tests phytochimiques | 26 |
| 3.6.1. | Alcaloïdes | 26 |
| 3.6.2. | Tannins | 27 |
| 3.6.3. | Flavonoïdes | 27 |
| 4. | Préparation des shampooings..... | 27 |
| 4.1. | Formulation..... | 27 |
| 4.2. | Ajout de l'huile et conservation de formulations | 28 |
| 4.3. | Ajout des extraits et conservation de formulations | 28 |
| 5. | Caractérisation des shampooings | 28 |
| 5.1. | Analyse organoleptique | 28 |
| 5.2. | Analyses physico-chimiques et fonctionnelle | 28 |
| 5.3. | Les activités antioxydants des shampooings | 29 |
| 5.3.1. | Méthode de réduction du radical libre DPPH | 29 |
| 5.3.2. | Méthode de la réduction du fer FRAP | 31 |
| | CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISCUSSIONS..... | 32 |
| 1. | Rendement | 33 |
| 2. | Propriétés des substances extraites de clou de girofle | 33 |
| 2.1. | Propriétés organoleptiques..... | 33 |
| 2.2. | Activité antioxydante..... | 34 |
| 2.2.1. | Test de piégeage du radical libre : DPPH | 34 |
| 2.2.2. | Test de la réduction du fer : FRAP..... | 36 |
| 2.3. | Activité antimicrobienne | 37 |
| 2.4. | Tests phytochimiques | 39 |
| 3. | Formulation des shampooings | 40 |
| 3.1. | Analyse organoleptique | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Détermination de pH..... | 41 |
| 3.3. Activité antioxydante des shampooings..... | 42 |
| 3.3.1. Résultats du test de piégeage du radical libre DPPH* | 42 |
| 3.3.2. Résultats du test de la réduction de fer : FRAP..... | 44 |
| CONCLUSION GENERALE | 46 |
| REFERENCES | 48 |

INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes aromatiques et médicinales sont des plantes appréciées pour leurs propriétés aromatiques, gustatives et thérapeutiques. Elles ont été utilisées depuis des milliers d'années dans différentes cultures à travers le monde pour leurs bienfaits sur la santé et leur utilisation dans divers domaines. Dans le monde végétal, les plantes contiennent beaucoup de substances bioactives (Vârban et al. 2009). Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Vârban et al. 2009). En effet, ces plantes médicinales peuvent fournir une source naturelle d'agents antibactériens et antioxydants à utiliser dans différentes applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et autre.

Le *Syzygium aromaticum* ou le giroflier est une plante aromatique utilisée traditionnellement mais également dans le domaine médicinale à cause de sa richesse en polyphénols (Medfouni et al, 2018).

La science confirme les différents avantages des plantes aromatiques et de leurs extraits ainsi que leurs huiles essentielles (Chagra et al, 2019). Ils sont très utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs, dans les cosmétiques, les parfumeries, l'industrie de shampoings et de détergents en volume impressionnant (Chagra et al, 2019). En effet, le clou de girofle est une épice à usage polyvalent. Elle contient de nombreux composés actifs, tels que l'eugénol, qui possède des propriétés antimicrobiennes et d'antioxydant (Medfouni et al, 2018).

Les cosmétiques à base de produits naturels sont populaires à travers le monde parce qu'ils donnent l'impression d'avoir une plus grande pureté (Mainkar et al, 2001). Le Shampoing est la forme la plus communément utilisée pour le traitement capillaire. Il était principalement produit pour laver les cheveux et le cuir chevelu (Aghel et al, 2010). Il est parmi les produits hygiéniques les plus vendus dans le monde (Emmanuelle et al, 2013).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et la valorisation des substances bioactives telles que les substances naturelles douées d'activité d'antioxydant qui présentent un intérêt dans le domaine cosmétique. L'objectif principal de ce travail est d'une part l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits et l'huile essentielle de l'espèce *Syzygium aromaticum* selon la méthode de piégeage du radical libre DPPH et par la méthode de réduction ferrique FRAP, et d'autre part, l'emploi de ces substances actives dans la formulation de shampoing.

Il faudrait préciser que l'idée de ce travail est une propre initiative de l'étudiante Sahouli Amina, et qui rentre dans le cadre de la réalisation de son stage de Master.

Le contenu de ce mémoire est composé de trois chapitres :

- **Le premier chapitre** est consacré à la recherche bibliographique et se compose de deux parties : La première partie sur les généralités sur le clou de girofle, et la deuxième sur des généralités sur le shampoing.
- **Le deuxième chapitre** présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir : extraction de l'huile essentielle et les extraits du clou de girofle, l'activité biologique et la formulation des shampoings.
- **Le troisième chapitre** présentera les différents résultats obtenus suivi de discussion et nous terminerons par une conclusion générale et perspectives.

CHAPITRE 01

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité sur le Clou de girofle

1.1. Introduction

Syzygium aromaticum ou (*Eugenia caryophyllum*), communément appelé « kranfal » et en français (girofler, clou de girofle) appartient à la famille des Myrtacées. Il est originaire des îles Maluku (ou Moluques) en Indonésie (Ghedira et al, 2010).

Clou de girofle est l'épice la plus utilisée pendant plusieurs siècles en conservation des aliments. Grâce à ces composants phénoliques comme l'eugénol, l'acétate d'eugénol et l'acide gallique, il est utilisé en pharmacie et cosmétologie (Diego Francisco et al, 2014).

L'Indonésie est le principal producteur mondial. (Penot et al, 2021), Madagascar est le premier exportateur mondial de girofle depuis la fin du XIXe siècle (Fourcin et al, 2015) avec une quantité moyenne annuelle. L'Indonésie est le plus gros pays producteur (7 fois ce que produit Madagascar) et le premier consommateur de clou de girofle notamment pour les cigarettes "Kretelè" (Fourcin et al, 2015).

1.2. Description de la plante

1.2.1. Définition

Le girofle ou girofler est un arbre originaire des Iles Moluques dans l'archipel indonésien. Les clous sont en fait des boutons de fleurs. De couleur verte puis rouge une fois mûrs, les clous se parent de leur jolie couleur brune lors de la phase de séchage, qui se déroule à l'air libre pendant un mois. L'odeur est aromatique caractéristique, la saveur est brûlante. Le clou comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe, longue de 10 à 12 mm pour un diamètre de 2-3 mm (correspondant à l'ovaire infère) et une « tête » renflée, globuleuse (4-6 mm de diamètre), entourée par les 4 lobes divergents des sépales (Goetz et al, 2012).



Fig. 1-1: Clou de girofle

Le giroflier (*Syzygium aromaticum* L.) est cultivé pour deux produits distincts : le clou qui est le bouton floral séché cueillis avant leur épanouissement, et l'essence (ou huile essentielle) issue de la distillation des feuilles, de griffes ou de clous et dont la valeur est liée à sa forte teneur en eugénol (Penot et al, 2021), (Razafimamonjison et al, 2016). Il est aussi cultivé pour en extraire une essence très riche en eugénol c'est là l'une des différences entre le girofle et la plupart des autres plantes herbacées (Razafimamonjison et al, 2016).

1.2.2. Origine du nom

- ✓ **Nom commun :** Giroflier.
- ✓ **Nom du fruit:** Clou de girofle.
- ✓ **Nom scientifique:** *Eugenia caryophyllum*, *Syzygium aromaticum* (L) Merr.et Perry
- ✓ **Origine:** Indonésie. Madagascar.

Tableau 1-1 : Classification botanique giroflier (Goetz et al, 2012).

| | |
|---------------------------|---|
| Règne | <i>Plantae</i> |
| Sous-règne | <i>Tracheobionta</i> |
| Embranchement | <i>Magnoliophyta (= Phanerogames)</i> |
| Sous-embranchement | <i>Magnoliophytina (= Angiospermes)</i> |
| Classe | <i>Magnoliopsida (= Dicotyledones)</i> |
| Sous-classe | <i>Rosidae</i> |
| Ordre | <i>Myrtales</i> |
| Famille | <i>Myrtaceae</i> |
| Sous-famille | <i>Mytoideae</i> |
| Genre | <i>Syzigium</i> |
| Espèce | <i>S. aromaticum</i> (L) Merr. & Perry |

1.2.3. La culture du giroflier

Cet arbre pousse dans des sols profonds, frais, bien drainés que l'on trouve généralement sur les bords humides à l'est des îles d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre jusqu'à 20 mètres de haut.

Le giroflier fleurit deux fois par an, de juillet à décembre. Le meilleur moment pour récolter les tiges florifères, également appelées girofles, est juste avant l'ouverture de la corolle (voir Fig. 1.2), moment auquel elles commencent à virer au rose. Les capes de girofle sont ensuite laissées à sécher sur des argiles au soleil ou sur une flamme chaude. Lors du séchage, les feuilles perdent entre 67 et 72 % de leur teneur en eau (Medfouni et al, 2018). Il est possible de le récolter annuellement pour 3 à 4 kilogrammes par arbre pendant plus de 25 ans (Lobstein et al, 2017).

Les clous sont séparés des griffes une fois la cueillette terminée à la main. Pour permettre leur conservation, les pétales de rose seront séchés : 35 kg de pétales frais donneront 10 kg de pétales séchés. Ils seront ensuite préparés pour la distillation (Barbelet et al, 2015).



Fig. 1-2: Clou rose récolté avant l'épanouissement de la fleur (Barbelet et al. 2015)

1.2.4. Composition chimique de *Syzygium aromaticum*

Le clou de girofle est riche en substances bioactive telle que :

L'huile essentielle (20%): L'eugénol est le composé principalement responsable de l'arome du clou de girofle et constitue 72 à 90% de l'huile essentielle de girofle (Bouzaa et al, 2022). Les autres constituants courants de l'huile essentielle comprennent l'acétate d'eugénol (5 à 10

%), le β -caryophyllène (5 à 12%), le salicylate de méthyle, le pinène, la vanilline et l' α -humulène.

Autres constituants : flavonoïdes (environ 0,4%), tanins (environ 12%), acide phénolique, stéroïls, tri terpène et des chromons (Medfouni et al, 2018).

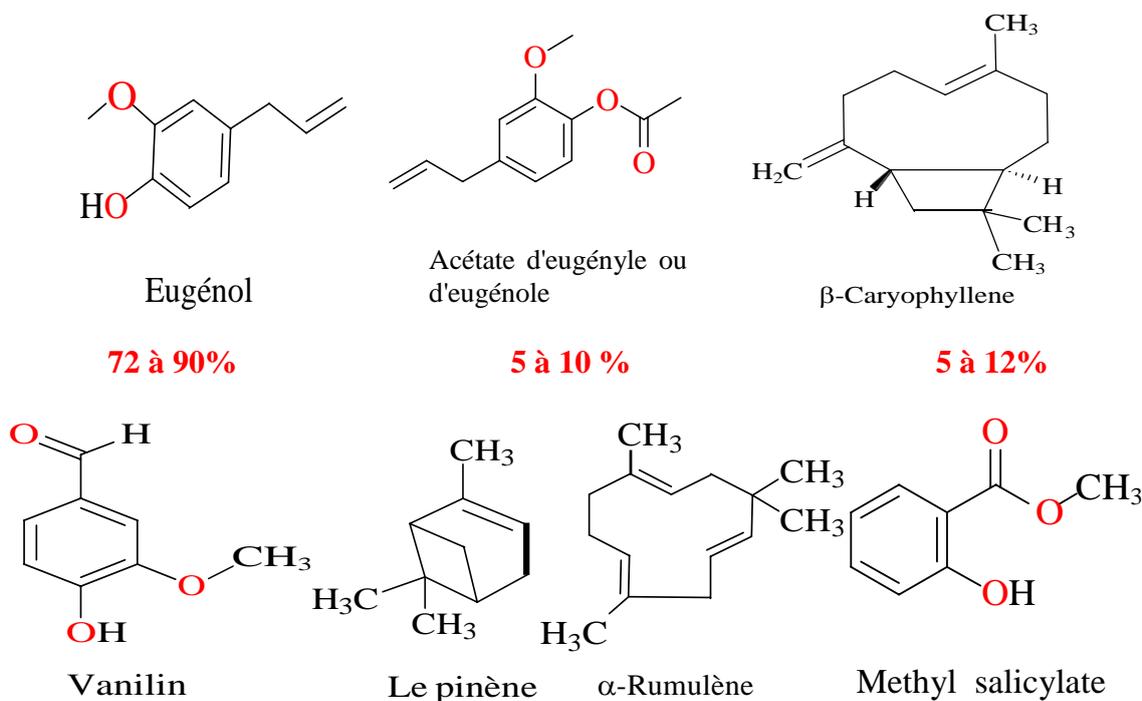


Fig. 1-3 : Structures principaux constituants d'huile de *S.aromaticum*

1.2. Les techniques d'extraction

Le procédé d'extraction influe directement sur la qualité des plantes et sur le rendement de l'extraction (Nait Achour, 2012). Il y a plusieurs procédés d'extraction utilisés à ce jour tels que l'infusion, la macération mais et l'hydrodistillation.

✓ Hydrodistillation

La technique la plus courante et simple pour distiller les huiles essentielles. Cette méthode implique d'immerger la matière première végétal dans de l'eau, puis de porter le mélange à ébullition. La distillation se déroule généralement à pression atmosphérique. Les vapeurs produites sont ensuite condensées à l'aide d'un système de réfrigération par circulation d'eau.

Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs phénomènes interviennent, permettant les échanges de substances entre les phases solides, liquide et vapeur. Cela

explique pourquoi de nombreux paramètres influencent la qualité et le rendement de la production de ces essences végétales.

✓ **Macération :**

Cette méthode consiste à immerger la matière végétale dans un solvant froid (eau; acétone; éthanol). Puis on laisse macérer pendant 24h ou 48h. Après macération le mélange est filtré et le solvant sera éliminer par évaporation.

1.3. Propriétés biologique et pharmacologique

L'huile essentielle de Clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) possède plusieurs propriétés bénéfiques. Elle a été associée à une réduction de l'inflammation, à un effet inhibiteur sur l'activité antivirale et à un potentiel agent anti-cancérigène. De plus, elle a démontré son efficacité en tant qu'agent insecticide pour lutter contre les ravageurs des cultures (Banouh et *al*, 2019).

✓ **Activité antioxydante**

Les termes tels qu'antioxydants, stress oxydant, radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène sont devenus omniprésents dans le domaine des sciences biologiques et médicales. Cependant, il est important de rappeler que ces concepts ne sont pas nouveaux, car leur découverte remonte à 1969. Depuis lors, cette découverte a été à l'origine de nombreuses recherches scientifiques sur les antioxydants.

Les huiles essentielles et les fractions volatiles sont des sources de composés phénoliques naturels qui suscitent l'intérêt des chercheurs. En effet, ces composés peuvent être utilisés dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques pour réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques, qui présentent des risques potentiels pour la santé (Benhamidat et *al*, 2022), (Bouzaa et *al*, 2022). Par exemple, les huiles essentielles de cannelle, de clou de girofle et de thym ont démontré leur pouvoir anti radicalaire et antioxydant grâce au test du radical libre DPPH. De même, l'huile essentielle de clou de girofle présente une bonne activité antioxydante (Diego Francisco et *al*, 2014), (Medfouni et *al*, 2018).

✓ **Activité antimicrobienne**

Le clou de girofle contient de l'huile essentielle riche en eugénol, un composé connu pour ses propriétés antibactériennes, antiseptiques et antifongiques. De plus, l'huile essentielle de clou de girofle contient de l'acétate d'eugénol, qui présente également des propriétés antibactériennes. L'huile essentielle de clou de girofle a démontré une activité antifongique

puissante contre les pathogènes fongiques opportunistes tels que le *Candida albicans*. (Bouzaa et al, 2022), (Medfouni et al, 2018).

2. Généralités sur le shampoing

2.1. Définition d'un shampoing

Le mot "shampoing" vient de l'hindi (l'une des principales langues de l'Inde) "champoo", qui signifie "massage", "pétrir". Par extension, elle a été appliquée sur le nettoyage des cheveux et du cuir chevelu. Le shampoing est un produit de beauté ainsi qu'un traitement important. Il a de multiples effets tels que l'entretien, le nettoyage du cuir chevelu et des cheveux, l'élimination des cellules mortes, du sébum et des bactéries, la promotion de la circulation sanguine, l'amélioration de la fonction du cuir chevelu et de son activité. Il se présente généralement sous la forme d'un liquide ou d'une crème, formulé avec un simple mélange d'actifs tonifiants, pour nettoyer et éventuellement revitaliser les cheveux (Grabis et al, 2022). En effet, la fréquence des shampoings est limitée généralement à une à deux fois par semaine.

2.2. Qualités requises d'un Shampoing

Les qualités d'un shampoing varient en fonction des besoins recherchés et des préférences souhaitées. Cependant, voici quelques-unes des qualités recherchées généralement dans un bon shampoing (Emmanuelle et al, 2013) :

- ✓ **Nettoyage efficace** : Un bon shampoing doit nettoyer vos cheveux en éliminant l'excès d'huile, la saleté, les résidus de produits capillaires et autres impuretés. Il devrait laisser les cheveux propres et frais.
- ✓ **Douceur** : Un bon shampoing doit être suffisamment doux pour ne pas agresser ou irriter le cuir chevelu et les cheveux. Il est censé maintenir l'équilibre du cuir chevelu et prévenir les irritations.
- ✓ **Hydratation** : Un shampoing de qualité doit aider à maintenir l'hydratation des cheveux. Il peut contenir des agents hydratants tels que des huiles naturelles, des protéines ou des ingrédients comme le panthénol, qui aident à retenir l'humidité dans les cheveux
- ✓ **Adapté au type de cheveux** : Différents types de cheveux nécessitent des soins particuliers. Un bon shampoing devrait être adapté au type de cheveux, qu'il s'agisse de cheveux secs, gras, bouclés, colorés, abîmés, etc. Il peut contenir des ingrédients spécifiques pour répondre aux besoins particuliers de chaque type de cheveux.

✓ **Nourrissant** : Un shampoing de bonne qualité peut apporter des nutriments essentiels aux cheveux pour les renforcer, les protéger et améliorer leur santé globale. Il peut contenir des vitamines, des extraits de plantes, des protéines ou d'autres ingrédients bénéfiques pour les cheveux.

✓ **Bonne odeur** : Bien que cela relève davantage des préférences personnelles, un bon shampoing laisse généralement une odeur agréable sur les cheveux, qui persiste pendant un certain temps après le lavage.

✓ **Respectueux de l'environnement** : De plus en plus de personnes recherchent des shampoings respectueux de l'environnement, avec des ingrédients durables, biodégradables et des emballages recyclables.

Il est important de noter que les besoins capillaires varient d'une personne à l'autre, il peut donc être nécessaire d'expérimenter différents shampoings pour trouver celui qui convient le mieux à chaque individu.

2.3. Composition d'un Shampoing

Un shampoing est un produit utilisé pour laver et nettoyer les cheveux. Sa composition peut varier en fonction de la marque et du type de shampoing, mais voici les ingrédients couramment utilisés dans la plupart des shampoings :

2.3.1. Eau : L'eau est la base du shampoing et sert de solvant pour les autres ingrédients.

2.3.2. Tensioactifs : Les tensioactifs sont des agents nettoyants qui éliminent la saleté, l'excès de sébum et les impuretés des cheveux. Les tensioactifs couramment utilisés comprennent le Lauryl sulfate de sodium (SLS), le Lauryl sulfate de sodium éthoxylé (SLES) et le cocamidopropyl bétaine.

2.3.3. Agents épaississants : Les agents épaississants donnent au shampoing sa consistance visqueuse. Ils aident à stabiliser la formulation et à empêcher les ingrédients de se séparer. Des substances telles que le chlorure de sodium (sel) ou des polymères synthétiques peuvent être utilisées à cette fin.

2.3.4. Agents conditionneurs : Les agents conditionneurs aident à adoucir les cheveux, à les rendre plus faciles à coiffer et à prévenir les nœuds. Certains exemples courants sont les silicones, les huiles végétales, les protéines et les extraits de plantes.

2.3.5. Agents moussants : Les agents moussants produisent la mousse lorsque vous frottez le shampoing dans vos cheveux. Le SLS et le SLES mentionnés précédemment sont également responsables de la formation de mousse.

2.3.6. Parfums : Les parfums sont ajoutés pour donner une odeur agréable au shampooing.

2.3.7. Conservateurs : Les conservateurs sont utilisés pour empêcher la croissance de bactéries, de moisissures et d'autres micro-organismes dans le shampooing. Les conservateurs couramment utilisés sont les parabènes, le Phénoxyéthanol, les sulfites et les dérivés de formaldéhyde.

2.3.8. Colorants : Les colorants peuvent être ajoutés pour donner une teinte spécifique au shampooing.

Il est important de noter que certains shampooings peuvent contenir d'autres ingrédients spécifiques en fonction de leurs propriétés ciblées.

2.3. Formule générale des shampooings

Les shampooings sont généralement présentés sous formes liquide, gel ou crème. Leur fabrication est assurée selon un procédé similaire à celui des détergents liquides, qui consiste en un simple mélange des différents ingrédients. Le tableau I.1 présente une formule générale adoptée dans la formulation des shampooings liquides.

Tableau 1.2 : Formule générale d'un shampooing liquide (Bounjoua et al, 2014).

| Ingrédient | Proportion (%) |
|--|-----------------------|
| Tensioactifs (agent lavante) | 15 - 25 % |
| Stabilisateur de mousse | 1 - 4 % |
| Epaississants | 0 - 5 % |
| Additifs cosmétiques ou traitants | QS |
| Séquestrant (EDTA Na) | 0 - 0,2 % |
| Conservateur(s) | 0,1 - 0,3 % |
| Eau purifiée | QS |
| Parfum | QS |
| Colorant | QS |

QS : Quantum Satis (quantité requise).

CHAPITRE 02

PARTIE

EXPERIMENTALE

1. Introduction

Cette partie concerne la mise au point d'un shampoing standard, avec un minimum d'ingrédients chimiques, à base d'extrait et d'huile essentielle de clou de girofle. Le protocole d'extraction d'huile essentielle et d'extrait de clou de girofle est présenté ici ainsi que le matériel et les produits utilisés. Les méthodes d'évaluation des propriétés physico-chimiques, organoleptiques et fonctionnelles des shampoings formulées sont également citées dans cette partie.

2. Matériel et produits utilisés

2.1. Matériel végétal

La matière végétale utilisée dans cette étude est le clou de girofle obtenu dans le commerce. Le clou de girofle procuré est bien sélectionné afin d'utiliser dans notre travail que des parties entières puis essuyé avec une serviette avant d'être finement broyé.



Fig. 2.1 : Clou de girofle entier, après broyage

La poudre fine de couleur marron et odeur fort a été stocké dans une boîte bien fermé jusqu'à utilisation.

2.2. Matériel du laboratoire

L'appareillage, les réactifs chimiques et la verrerie utilisés durant la réalisation de la partie pratique de ce travail sont résumés dans le **Tableau. 2-1.**

Tableau 2-1 : Réactifs, verreries et matériels utilisés.

| Verreries | Appareils | Réactifs chimiques |
|---------------|----------------------|---|
| Béchers | Agitateur magnétique | Acide citrique (C ₆ H ₈ O ₇) |
| Erlenmeyer | Balance électrique | Chlorure de sodium (NaCl) |
| Entonnoir | Etuve | Eau distillée (H ₂ O) |
| Eprouvette | pH mètre | Glycérine (C ₃ H ₈ O ₃) |
| Spatule | Plaque chauffante | Lauryl sulfate de sodium (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S) (SLS) |
| Papier filtre | Thermomètre | Méthanol (CH ₃ OH), Ethanol (C ₂ H ₅ OH) |
| Boite à pétri | Bain marie | Acétone(C ₃ H ₆ O) |
| Entonnoir | Spectrophotomètre | Acide ascorbique (C ₆ H ₈ O ₆) |
| | | 2,2-Diphényl-1-PicrylHydrazyle (C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆) |
| | | ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN) ₆) |
| | | Acide trichloroacétique (C ₂ HCl ₃ O ₂) |
| | | Phosphate tampon (H ₂ KO ₄ P) |

3. Protocole expérimental

Le diagramme de la fig. 2.2 montre l'enchaînement des étapes des différentes phases de l'expérimentation de notre étude.

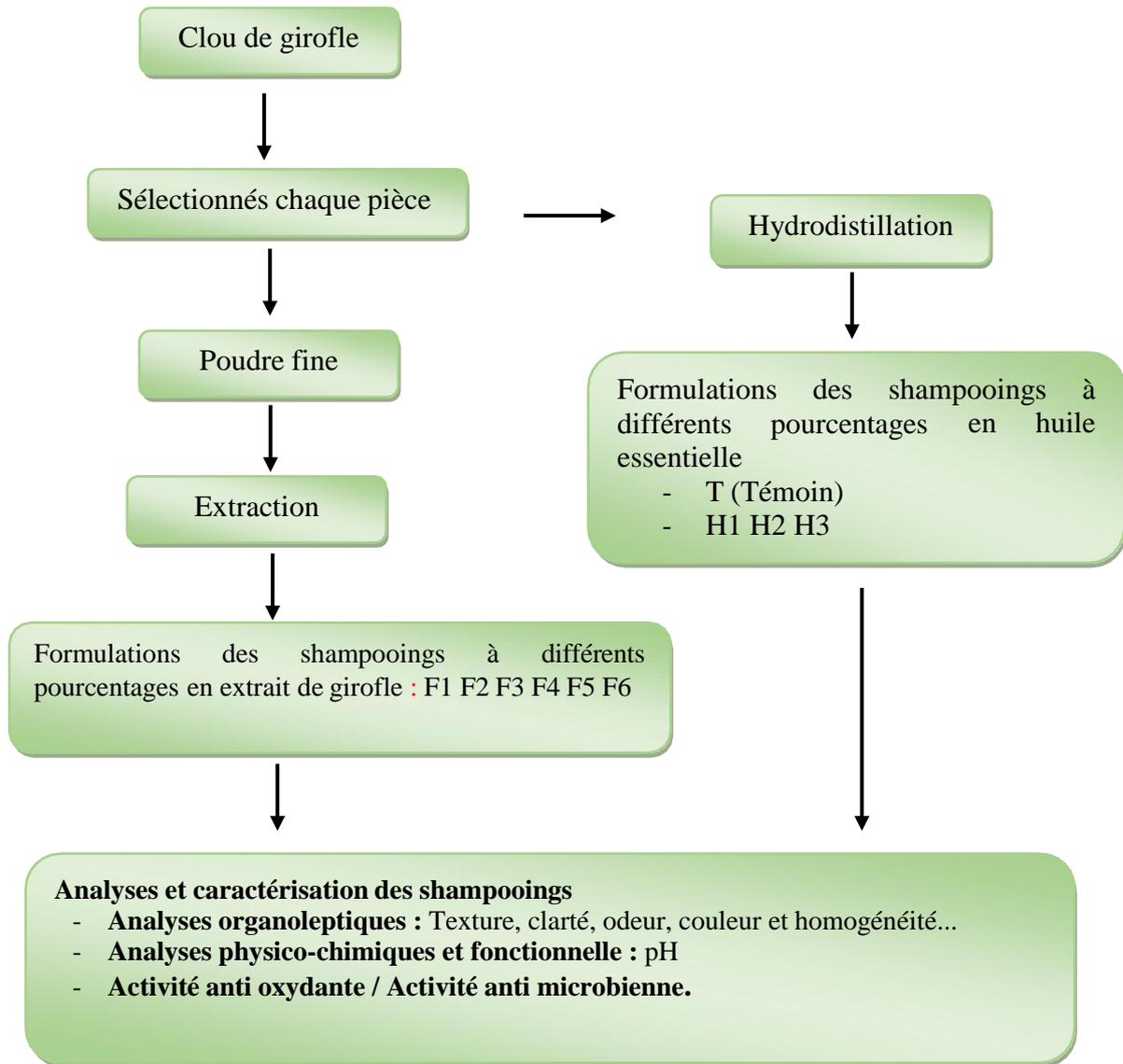


Fig. 2.2 : Diagramme du protocole expérimental de l'étude formulation de shampoing à base de clou de girofle.

3.1. Méthode d'extraction

L'extraction de clou de girofle a été réalisée par différentes méthodes basées sur des protocoles de la littérature.

3.1.1. Extraction par macération dans un mélange de solvants

- Peser 10 grammes de la matière végétale sous forme de poudre de Clou de girofle ;
- Ajouter la poudre au 200 mL de mélange de solvants (50 mL éthanol, 50 mL méthanol, 50 mL acétone, 50 mL d'eau distillée) dans un erlenmeyer ;
- Laisser le mélange reposer pendant 24h ;

- Filtrer le mélange après 24h sur un papier filtre ;
- Le filtrat récupéré est ensuite mis dans l'étuve à $T=37^{\circ}\text{C}$ jusqu'à évaporation complète du solvant ;
- Après disparition complète du solvant, un film foncé est récupéré au fond du cristallisoir. Ce film est gratté à l'aide d'une spatule et récupéré sous forme d'une poudre marron foncé puis est mis à sécher pendant 24h dans l'étuve ;
- Le rendement d'extraction est calculé lorsque le poids de cette poudre est constant.
- Recueillir l'extrait dans un flacon et conserver dans le frigo à 4°C jusqu'à utilisation. ;



Fig. 2.3 : Extraction par macération dans un mélange de solvants

Fig. 2.4 : filtration du mélange après 24h

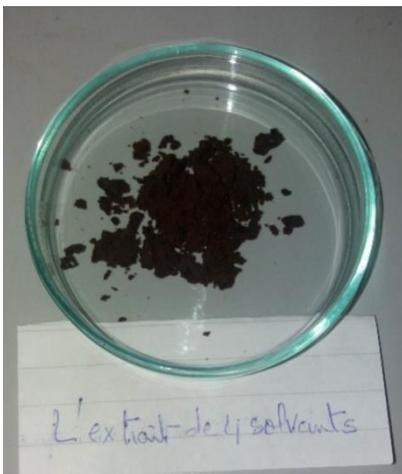


Fig. 2.5 : Extrait sec de la macération de clou de girofle dans le mélange de solvants de solvants

3.1.2. Extraction par infusion dans l'eau

- Mettre 10 grammes de la matière végétale en poudre dans un erlenmeyer ;

- Ajouter 100 mL d'eau distillée chauffée à 100°C, puis mettre le mélange dans un bainmarie pendant 30 min ;
- Laisser macérer et infuser pendant 24h avant de filtrer sur papier filtre ;
- Le filtrat est mis dans l'étuve jusqu'à évaporation complète de l'eau ;
- Gratter l'extrait situé dans le cristallisoir après 24h de séchage avec une spatule ;
- Peser le cristallisoir afin de calculer le rendement d'extraction ;
- Recueillir l'extrait dans un flacon et le conserver dans le frigo à 4°C 'jusqu'à utilisation.



Fig. 2.6 : Extraction par infusion dans l'eau



Fig. 2.7 : Extrait sec par infusion dans l'eau

3.1.3. Extraction par macération dans le méthanol

- Peser 30 grammes de la matière végétale ;
- Mettre la matière végétale (30g) dans un erlenmeyer avec 100 mL de méthanol ;
- Agiter le mélange sur un agitateur magnétique pendant 48h à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- Filtrer le mélange après 48h sur un papier filtre ;
- Mettre le filtra dans l'étuve jusqu'à disparition complète du solvant ($T=37^{\circ}\text{C}$) ;
- Gratter l'extrait situé dans le cristallisoir après séchage avec une spatule ;
- Peser le cristallisoir afin de calculer le rendement d'extraction ;
- Recueillir l'extrait dans un flacon et le conserver en frigo à 4°C jusqu'à utilisation.



Fig. 2.8 : Extraction par macération dans le méthanol

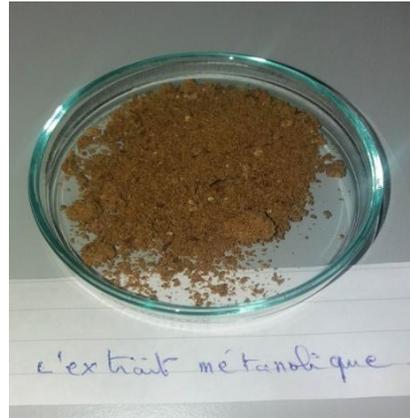


Fig. 2.9 : Extrait sec par méthanol

3.2. Extraction de l'huile essentielle de clou de girofle

Généralement, la distillation est un procédé de séparation fondé sur la différente composition du liquide avec la vapeur résultante. La technique comprend la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides qui en résulte. On parle de distillation simple ou fractionnée lorsqu'il s'agit de liquides miscibles. On peut également distiller des liquides non miscibles. Ceci est vrai pour l'hydrodistillation des huiles essentielles. En ce qui nous concerne, l'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation dans un appareil du type Clevenger.

3.2.1. Procédé d'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. Le tout se met à ébullition et l'opération est effectuée à pression atmosphérique.

3.2.2. Mode opératoire

500 g de boutons de clou de girofle émerger dans l'eau qu'on fait bouillir dans un ballon de 1L surmonté d'un réfrigérant. Le chauffage est effectué à l'aide d'une chauffe ballon. Après 2 heures on récupère à l'aide d'une pipette pasteur un liquide trouble de couleur blanchâtre. Après refroidissement de ce liquide, il y a apparition de deux phases ; l'huile essentielle et l'hydrolat. La densité d'huile est supérieure à celle de l'hydrolat qui est une phase aqueuse (Banouh et al, 2019).



Fig. 2.10 : Extraction de l'huile essentielle du clou de girofle par Hydrodistillation



Fig. 2.11: récupération de l'hydrolat



Fig. 2.12: Récupération de l'huile essentielle et l'hydrolat

3.3. Rendement

La détermination du rendement d'extraction donne une estimation de l'efficacité du procédé d'extraction.

Le rendement est calculé suivant la relation suivante :

$$R\% = \frac{\text{la masse d'extrait sec}}{\text{la masse de la matière végétale}} \times 100$$

- ✓ Rendement d'extraction par macération dans le mélange de solvants ($R_1\%$) :
- ✓ Rendement d'extraction aqueux ($R_2\%$) :
- ✓ Rendement d'extraction méthanolique ($R_3\%$) :
- ✓ Rendement obtenu de la manipulation de l'extraction de l'huile essentielle du clou de girofle par hydrodistillation
- ✓ Rendement de l'hydrolat du l'hydrodistillation

3.4. Les activités antioxydants des extraits et huile essentielle de clou de girofle

L'activité antioxydante a été évaluée selon deux tests : réduction du fer capteur de radicaux libres (FRAP) et piégeage des radicaux libres (DPPH) (Brand-Williams et al, 1995).

3.4.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH

✓ La préparation de la solution de DPPH :

Dans une fiole jaugée de 100mL dissoudre une masse de 0.006 g de DPPH dans 100mLde méthanol. Puis nous roulons la fiole dans un papier aluminium à l'abri de la lumière.

Ensuite, mettez-le sous agitation pendant 30 min. après les 30min nous mesurons l'absorbance qui doit être comprise entre [0,7- 1nm].

✓ **Préparation des dilutions de l'antioxydant :**

Nous devons préparer différentes dilutions de la solution mère dans méthanol, Pour obtenir plusieurs solutions filles. Et la préparation de blanc qui contient méthanol seul et le contrôle qui contient également 1mL méthanol et 1 mL de DPPH.

✓ **Dosage**

Dans des tubes à hémolyses, nous introduisons 1mL de chaque dilution. En plus de 1 mL de la solution méthanolique de DPPH. Suivie par une incubation à température ambiante et dans un endroit sombre pendant 30 min. Et ensuite on verse le mélange dans des cuves de colorimétrie pour mesurer l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/ Visible. Contre un témoin composé de 1mL de la solution de DPPH et de 1mL méthanol. Les valeurs d'absorbance obtenues sont converties en pourcentage à partir de formule suivante:

$$IP \% = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Où :

IP % : Pourcentage inhibition.

A₀ : Absorbance du contrôle.

A₁ : Absorbance de l'échantillon

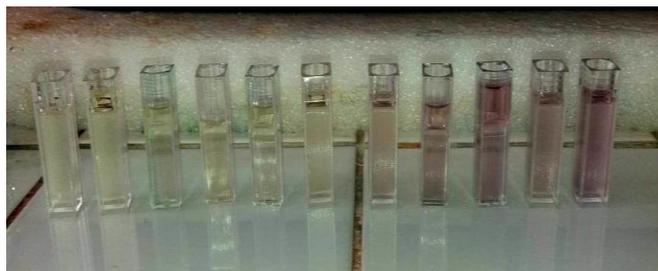


Fig. 2.13 : Réduction du radical DPPH du violet au jaune

✓ **Calcul des CI₅₀**

La valeur d'IC₅₀ exprime la concentration du produit nécessaire pour diminuer l'absorbance du DPPH de 50 % (inhibition de DPPH à 50 %). Les valeurs de l'indice IC₅₀ sont inversement liées à la capacité antioxydante. Les CI₅₀ sont calculées en traçant graphiquement les pourcentages d'inhibition par rapport aux concentrations des échantillons

testés, et en utilisant une régression linéaire pour déterminer la concentration à laquelle l'inhibition est de 50 % comme indiqué dans les figures ci-dessous (fig. 2-14 jusqu'à fig. 2-19).

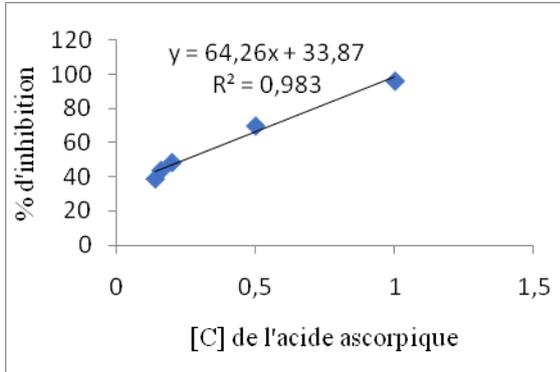


Fig. 2-14 : % d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique

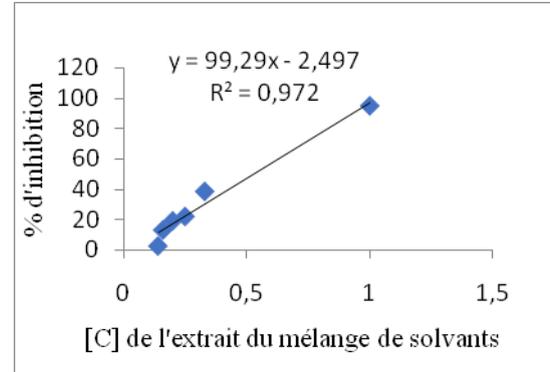


Fig. 2-15 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de clou girofle dans le mélange de solvants

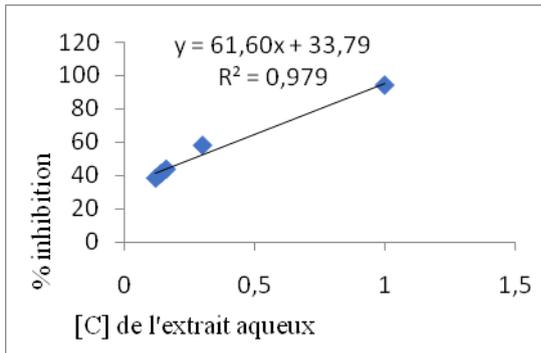


Fig. 2-16: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux

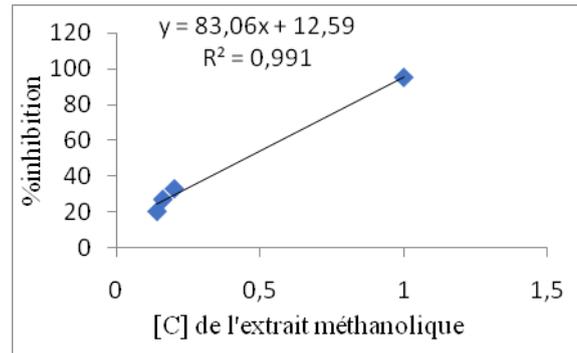


Fig. 2-17 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique

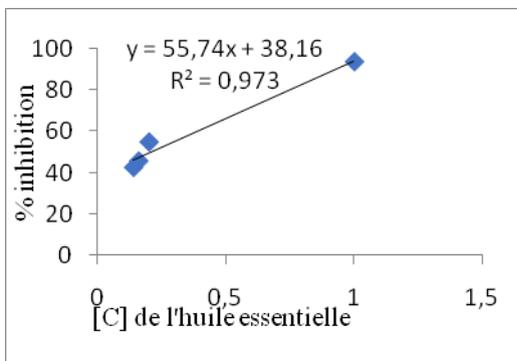


Fig. 2-18: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle

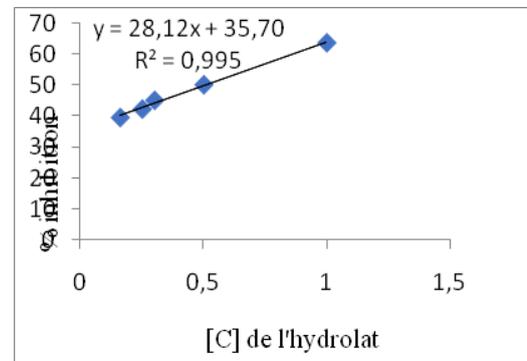


Fig. 2-19: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'hydrolat

3.4.2. Méthode de la réduction du fer FRAP

✓ **Principe :**

La méthode de FRAP est consacrée à mesurer la capacité à réduire l'ion ferrique Fe^{3+} sa couleur jaune a se transforme en ion ferreux Fe^{2+} bleu vert.

✓ **Protocole**

Le mélange réactionnel contenant 0,01mL d'huiles essentielles ou d'extrait (0.01mg) dans un 10 mL de MeOH a été mélangé avec du phosphate tampon 0,5 mL (0.2 M, pH 6,6) et ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (0,5 mL, 1 %, p/v). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min.

Une portion (0,5 mL) d'acide trichloroacétique (10 %, p/v) a été ajoutée au mélange pour stopper la réaction, qui a ensuite été centrifugé pendant 10 min. Puis prélever 1mL du surnageant de chaque concentration et ajoutez-y l'eau distillé (1 mL) et $FeCl_3$ (0,2 mL, 0,1 % p/v) puis agités vigoureusement.

L'absorbance a été mesurée à 700 nm dans un spectrophotomètre. Meilleure absorption de mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur plus élevé.



Fig. 2-20 : Réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} du jaune au vert (FRAP)

3.5. Activité antimicrobienne

✓ **Tests de l'activité antimicrobienne des extraits et huile essentielle de clou de girofle**

L'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des différents extraits, de l'hydrolat et de l'huile a été évaluée par la technique des puits de diffusion (Balouiri et *al*, 2016) contre des souches test de référence donnés dans le **Tableau 2-2**. La bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et la levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

Tableau 2-2 : Germes test de référence utilisés

| Germes test | Référence | Milieux appropriés |
|---|------------------|---------------------------|
| Bactéries à Gram positif | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 43300 | Chapman |
| Levures | | |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 | Sabouraud |
| *ATCC : American Type Culture Collection | | |

Protocole

✓ **Standardisation de l'inoculum des germes test**

A partir des cultures jeunes de 24 heures de chaque germe test (bactérie et levure) sur leurs milieux de culture appropriés, des suspensions en eau physiologique stérile ont été préparées. Les inocula microbiens ont été préparés et standardisés selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI M44-A2, 2009 ; CLSI M02-A12, 2015). La densité optique de la suspension bactérienne a été ajustée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde $\lambda = 620$ nm et pour la levure entre 0,11 et 0,14 à une longueur d'onde $\lambda = 530$ nm (turbidité équivalente à 0,5 McFarland) (Rodriguez-Tudela *et al*, 2001).

✓ **Réalisation de la technique des puits**

Des boîtes de Pétri contenant des milieux gélosés, Müller-Hinton (pour la bactérie) et Sabouraud (pour la levure) ont été préalablementensemencés par les suspensions des germes test. Pour ce faire, les extraits secs ont été mis en solution dans le méthanol pur en raison de 200 mg par 1 mL. Des puits de 6 mm de diamètre et 2,5 mm de profondeur ont été creusés dans la gélose, recevant 80 μ L de chaque extrait, de l'hydrolat et de l'huile testés. Et des puits témoins recevant 80 μ L de l'éthanol par des dépôts successifs tout en évitant les débordements. Les boîtes ont été laissées pendant 2 heures à 4°C pour permettre la diffusion des extraits, puis incubées pendant 24 heures à 37°C pour la bactérie et 35°C pour la levure. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.



Fig. 2.21 : La bactérie et la levure

3.6. Les tests phytochimiques

Ces tests consistent à identifier les différentes familles des métabolites secondaires existant dans la plante (EL-Haoud et *al*, 2018).

3.6.1. Alcaloïdes

Pour faire un test d'alcaloïdes nous avons préparé 1 mL de chaque extrait puis ajouté 5 mL d'HCl 1%. On chauffe le mélange au bain marie après on divise chaque solution en deux volumes égaux :

Le premier volume est traité par quelques gouttes du réactif de Mayer et le deuxième volume par le réactif de Wagner. L'apparition d'un brun ou blanc, indique la présence ou l'absence d'alcaloïdes

Préparations des réactifs

✓ **Réactif de Mayer :** Dissoudre 2,5 g de KI dans l'eau distillée avec 0.679 g de HgCl₂ dans 30 mL d'eau distillée puis compléter le volume total à 50 mL.

✓ **Réactif de Wagner :** Dissoudre 0,635 g I₂ avec 1g de KI et 37,5 mL d'eau distillé après ajuster le volume total à 50 mL.

3.6.2. Tannins

Mettre 1 mL d'extrait ou l'huile essentielle dans 2 mL d'eau et une petite quantité de FeCl₃. L'apparition de couleur verdâtre indique la présence des tanins.

3.6.3. Flavonoïdes

Mettre 5 mL d'extrait ou l'huile essentielle avec quelque goutte d'HCl et 0,5 mg de tournures de magnésium (Mg). L'apparition d'une couleur rouge-rose confirme la présence des flavonoïdes.

4. Préparation des shampooings

4.1. Formulation

Le shampooing préparé dans ce travail a été formulé à base de minimum de produits chimiques selon le protocole décrit par (Grabis et *al*, 2022). Les tableaux. 2-3 et 2-4 répertorient les pourcentages des différents ingrédients du témoin (T) ne contenant aucun principe actif et les formules H1, H2 et H3 avec différents pourcentage en huile essentielle, et les formules (F1, F2, F3, F4, F5, F6) à base d'extrait de clou de girofle.

Tableau. 2-3 : Formulations des shampooings à base d'huile essentielle de clou de girofle.

| Ingrédients | Témoin | H1 (1%) | H2 (2.5%) | H3 (5%) |
|-------------------|--------|-----------|-------------|-----------|
| SLS | 12% | 12% | 12% | 12% |
| Glycérine | 3.5% | 3.5% | 3.5% | 3.5% |
| NaCl | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% |
| Acide citrique | 0.1% | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Huile essentielle | - | 1% | 2.5% | 5% |
| Eau distillé | 100% | 100% | 100% | 100% |

Tableaux. 2-4 : Formulations des shampoings à base d'extrait de clou de girofle.

| Ingrédients | Formulations à base d'extrait du mélange des solvants | | | Formulations à base d'extrait méthanolique | | |
|-----------------|--|-------------|-----------|---|-------------|-----------|
| | F1 (1%) | F2 (2.5%) | F3 (5%) | F4 (1%) | F5 (2.5%) | F6 (5%) |
| SLS | 12% | 12% | 12% | 12% | 12% | 12% |
| Glycérine | 3.5% | 3.5% | 3.5% | 3.5% | 3.5% | 3.5% |
| NaCl | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% |
| Acide citrique | 0.1% | 0.1% | 0.1% | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Poudre extraite | 1% | 2.5% | 5% | 1% | 2.5% | 5% |
| Eau distillé | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |

Dans un bécher de 50 mL contenant de l'eau distillée chauffée à 70°C, une quantité de Lauryl sulfate de sodium (SLS) a été dissoute et le mélange est agité jusqu'à l'obtention d'une dispersion lisse et homogène. Les autres composants (NaCl, glycérine et acide citrique) sont solubles dans l'eau ont été préparés séparément, chacun dans un récipient séparé, puis ajoutés progressivement au mélange réactionnel pour éviter l'agrégation. Cette formule c'est la formulation de contrôle (T) (Grabis et al, 2022).

4.2. Ajout de l'huile et conservation de formulations

On procède à la préparation de trois formules de shampoing (H1, H2 et H3) avec des différents pourcentages en huile essentielle ; 1, 2,5 et 5%. L'huile essentielle a été ajoutée en dernière étape sous agitation à température ambiante pendant 30 min.

4.3. Ajout des extraits et conservation de formulations

On commence la préparation de six formules de shampoing (F1, F2, F3, F4, F5, F6) avec des différents concentrations en extraits ; 1, 2,5 et 5%. La poudre de clou de girofle a été dissoute dans l'eau distillée à température ambiante sous agitation pendant 30 min. Le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre. Les filtrats sont chauffés à 70 °C avant d'ajouter le SLS puis les autres ingrédients dans l'ordre (NaCl, glycérine, acide citrique).

Finalement, les formulations préparées ont été conservées dans des tubes étiquetés, puis divisées en deux. Le premier groupe a été destiné à l'analyse de l'évaluation physico-chimique, le deuxième groupe est gardé à température ambiante pour les analyses organoleptiques.

5. Caractérisation des shampoings

5.1. Analyse organoleptiques

Les formulations ont été évaluées en fonction de leur clarté, leur couleur, leur odeur et leur texture selon le protocole d'AlQuadeib et *al*, 2018 par un panel de 5 personnes.

5.2. Analyses physico-chimiques et fonctionnelle

✓ Détermination du pH

Le pH de différentes formulations a été mesuré à partir d'une solution de 10 % en shampooing dans de l'eau distillée à température ambiante 25°C (Kumar et *al*, 2010), (Al badi et *al*, 2014). Le pH de l'eau distillée est égal à $(6,96 \pm 0,02)$.

5.3. Activité antioxydante des shampoings

5.3.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH

C'est le même principe de La activités antioxydants des extraits et huile essentielle de clou de girofle. Donc on prépare les dilutions de dix shampoings et la solution de DPPH dans le méthanol de même quantité et incubé durant 30 min a près on passe a la lecture pour mesuré l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/ Visible.



Fig. 2.22 : Réduction du radical DPPH du violet au jaune pour dix shampoings

✓ Calcul des CI₅₀

Les CI₅₀ sont calculées en traçant graphiquement les pourcentages d'inhibition par rapport aux concentrations des échantillons testés, et en utilisant une régression linéaire pour déterminer la concentration à laquelle l'inhibition est de 50 % comme indiqué dans les figures ci-dessous (fig. 2-23 jusqu'a fig. 2-32).

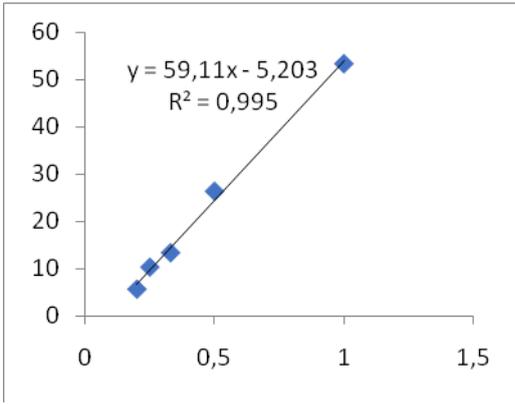


Fig. 2-23 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de témoin

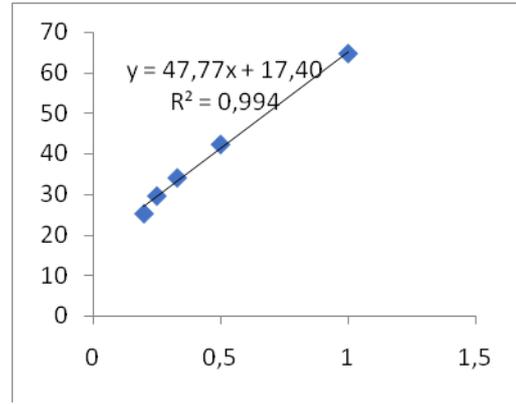


Fig. 2-24 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de H1

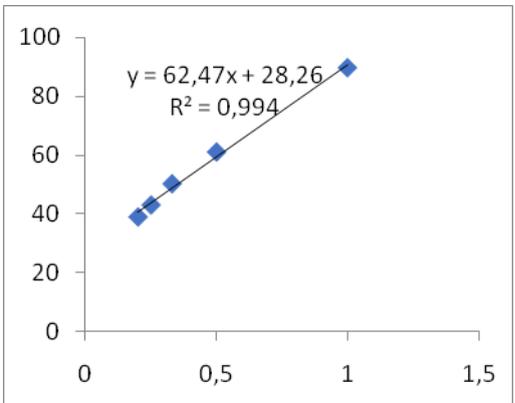


Fig. 2-25 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de H2

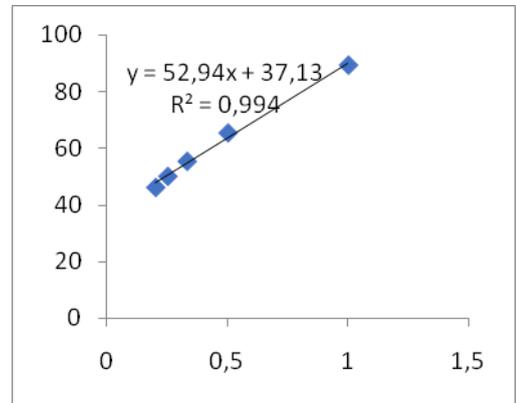


Fig. 2-26 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de H3

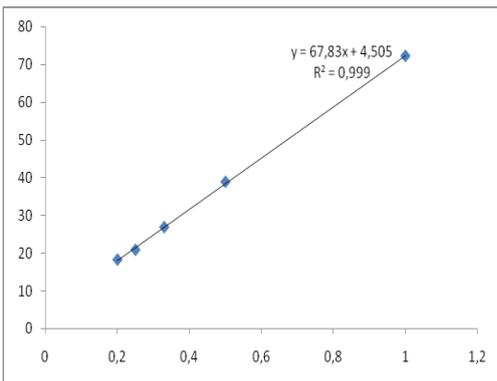


Fig. 2-27 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F1

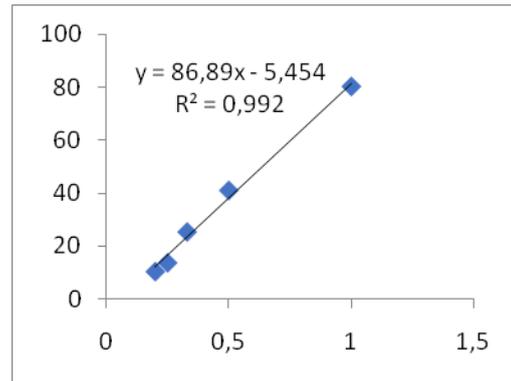


Fig. 2-28 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F2

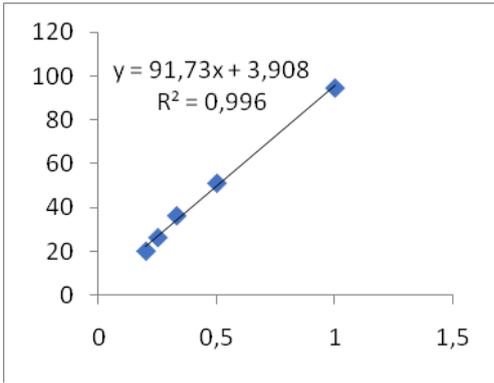


Fig. 2-29 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F3

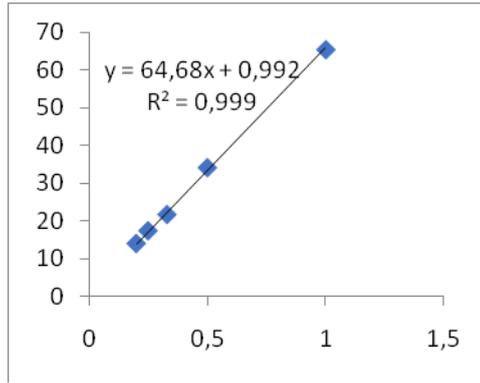


Fig. 2-30 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F4

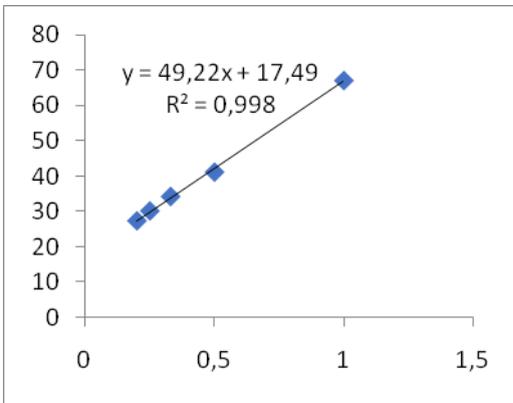


Fig. 2-31 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F5

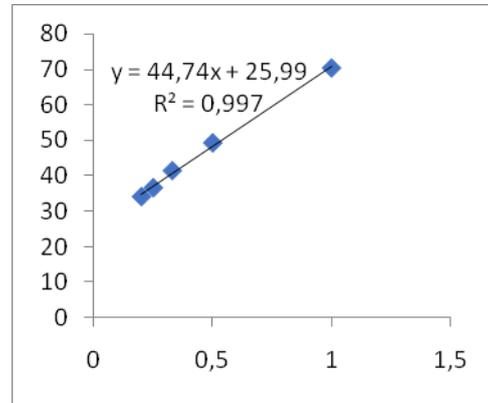


Fig. 2-32 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de F6

5.3.2 Méthode de la réduction du fer FRAP

Dans les tubes à hémolyses nous mettons 1 mL de l'échantillon de shampooing à différentes concentrations et nous y ajoutons 0,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2M, pH = 6,6) et 0,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium [k₃Fe(CN)₆] (1%). Le mélange est incubé dans l'étuve à 50°C. Après les 20 minutes d'incubation, nous ajoutons aux tubes 0,5 mL d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction. Ensuite, 1mL de chaque concentration est prélevé et ajouté à 1 mL d'eau distillée et 0,2 mL d'une solution de chlorure ferrique FeCl₃ (0,1%). Cette solution est analysée à une longueur d'onde de 700 nm par un spectrophotomètre (UV/ Visible).



Fig. 2.33 : Réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} du jaune au vert (FRAP) pour dix shampoings

CHAPITRE 03

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement

Les rendements d'extraction des extraits de clou de girofle par la méthode de mélange de solvants organiques, par infusion dans l'eau et dans le méthanol sont respectivement R₁ (30 %), R₂ (10 %) et R₃ (10%). Les rendements R₃ et R₂ sont faibles mais R₁ est en accord avec celui obtenu par Boucherit et *al*, 2016 (29,7%) en utilisant la même quantité de matière végétale et la même méthode d'extraction.

L'hydrodistillation de la matière végétale a permis d'obtenir l'huile essentielle avec un rendement égal à 3,4 %. Ce résultat est bien meilleur que celui trouvé par Adli et *al*. 2015 (0.84 %) et identique avec celui obtenu par Banouh et *al*, 2019 (3,4 %) en utilisant la même quantité de matière végétale dans l'hydrodistillation. Cette faible quantité s'explique par la perte d'huile dans la phase aqueuse dans l'hydrolat dont le rendement est égal à 53,05 %. D'après les normes de l'Association française de normalisation (AFNOR 2000) le rendement idéal de l'hydrodistillation du clou de girofle doit être compris entre 5 % à 8% (tableau 3-1).

Tableau 3-1 : Rendement de l'huile essentielle

| | Huile essentielle obtenue | Norme AFNOR | |
|------------|------------------------------|-------------|---------|
| | | Minimum | Maximum |
| Rendement% | 3,4 | 5 | 8 |

2. Propriétés des substances extraites de clou de girofle

2.1. Propriétés organoleptiques

Les propriétés organoleptiques sont basées sur des tests olfactifs et sont reportées dans le tableau 3-2.

Tableau 3-2 : Caractéristiques organoleptiques des produits d'extraction de clou de girofle.

| | Aspect | Couleur | Odeur |
|---|--|------------------|---|
| Norme AFNOR De l'huile essentielle | Liquide, mobile limpide, parfois légèrement visqueux | Jaune très clair | Epicée (caractéristique de l'eugénol) |
| Huile Essentielle obtenue | Liquide, mobile, limpide, visqueux avec le temps | Jaune clair | Forte odeur épicée et tonifiée |
| Extrait mélange de solvant | Solide | Marron foncé | Forte odeur |
| Extrait aqueux | Solide | Marron foncé | Forte odeur |
| Extrait méthanolique | Solide | Marron claire | Forte odeur |

2.2. Activité antioxydante

Nous avons étudié la présence d'une éventuelle activité antioxydante de l'huile essentielle (HE) de clou de girofle et des extraits obtenus en utilisant la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques) en comparant avec l'activité antioxydante de l'acide ascorbique (AA) qui est pris comme référence.

2.2.1. Test de piégeage du radical libre : DPPH

Le DPPH est un radical libre permettant de déterminer le potentiel de piégeage de HE et les extraits de clou de girofle grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (Soltani et *al*, 2021). Cette méthode consiste à mesurer la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde de 515 nm. Initialement, le radical DPPH est violet, mais il devient jaune lorsque son électron célibataire s'apparie pour former DPPH-H.

Les régressions linéaires obtenues et données dans le Chapitre 2 permettent de déterminer les CI_{50} . A rappeler que la valeur de CI_{50} exprime la concentration inhibitrice 50 % (CI_{50}) correspondant à la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. La valeur de l'indice CI_{50} est inversement liée à la capacité antioxydante. Le tableau 3-3 regroupe l'ensemble des résultats obtenus par la méthode de DPPH. Les CI_{50} des extraits et l'huile essentielle de clou de girofle sont représentés sur les histogrammes de la figure 3-1.

➤ Discussion

Les résultats de tableau 3-2 montrent une dépendance entre le taux d'inhibitions et les différentes concentrations. Nous pouvons noter que l'huile essentielle possède le plus fort pouvoir antioxydant avec une concentration de l'ordre de 0,16 mg/mL et une capacité de réduire le radical DPPH• à 45,53 %. Pour ce qui concerne les extraits et pour la même concentration, le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux est 43,57 % et pour l'extrait méthanolique il est égal à 13,4. La comparaison de l'activité du piégeage de DPPH entre l'huile essentielle et l'AA montre une meilleure activité antioxydante avec une CI_{50} de 0,21 mg/mL par rapport à celle de l'AA dont $CI_{50} = 0,25$ mg/mL. En effet, la valeur de la CI_{50} est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante et donc plus la valeur de CI_{50} d'un composé est faible plus son pouvoir antioxydant est fort.

Tableau 3-3 : Résultats de la méthode DPPH.

| Echantillon | | Activité antioxydante | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| Extrait mélange de solvant | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,33 | 0,25 | 0,2 | 0,16 | 0,14 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 94,8 | 38,68 | 22,34 | 19,41 | 13,4 | 2,93 |
| extrait aqueux | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,33 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | / |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 94,27 | 57,96 | 43,57 | 40,92 | 38,2 | |
| Extrait méthanolique | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,33 | 0,14 | 0,12 | / | / |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 95,89 | 32,75 | 26,81 | 20,02 | | |
| HE | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,2 | 0,16 | 0,14 | / | / |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 93,57 | 54,74 | 45,53 | 42,45 | | |
| Hydrolat | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 0,16 | / |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 63,58 | 50,1 | 45,1 | 42,3 | 39,6 | |
| Acide ascorbique | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,2 | 0,16 | 0,14 | / |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 96,34 | 70,01 | 48,6 | 43,93 | 39,02 | |

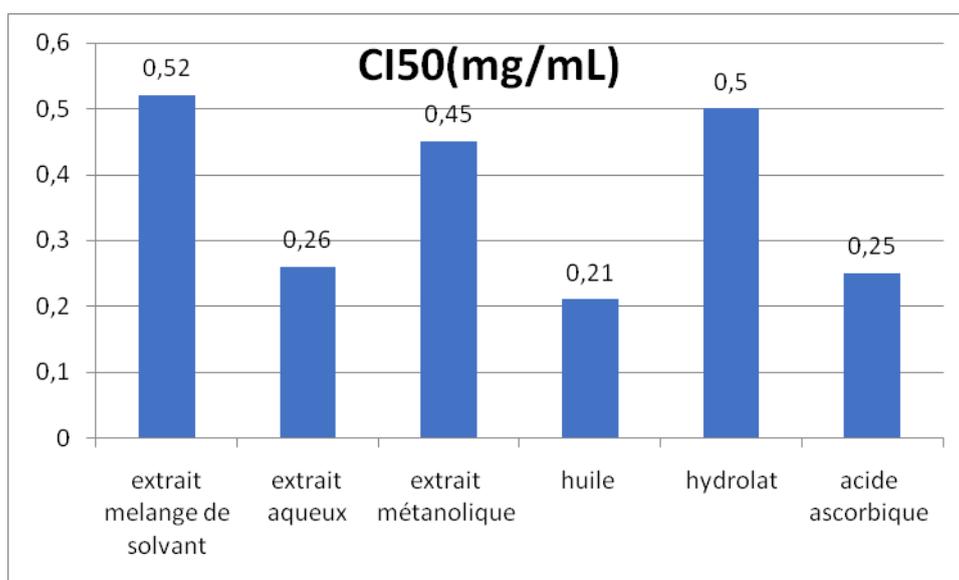


Fig.3-1 CI₅₀ des extraits et l'huile essentielle et l'hydrolat déterminées par la méthode DPPH.

L'extrait aqueux obtenue par infusion dans l'eau montre également un bon pouvoir réducteur avec CI₅₀ = 0.26 mg/mL. Pour les deux autres extrait méthanolique et l'extrait du mélange de solvants, leur la capacité d'inhiber les radicaux libre DPPH est plus faible des CI₅₀ égales à

0,45 mg/mL et 0,52 mg/mL respectivement. L'évaluation de cette activité indique qu'elle est dose-dépendante ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le taux d'inhibitions et la concentration des échantillons dans le milieu. D'après Zouhri et *al*, 2022 l'activité antioxydante de l'huile essentielle du clou de girofle est dose-dépendante.

La comparaison de l'activité de piégeage du DPPH de l'huile essentielle et des extraits avec ceux indiqués par l'acide ascorbique montre ainsi une bonne activité en tant qu'antioxydant ce qui est en accord avec Achiri et *al*, 2022.

2.2.2. Test de la réduction du fer : FRAP

Cet essai dépend de la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer (Fe^{2+}) ferreux qui se manifeste par le changement la couleur jaune de Fe^{3+} en une couleur Bleu vert pour le Fe^{2+} mesuré à 700 nm (Jayaprakash et *al*, 2001).

L'évaluation de l'activité antioxydante explique l'augmentation de la réduction de fer des échantillons par rapport l'acide ascorbique. Les courbes du pouvoir réducteur par la méthode FRAP des trois extraits, l'huile essentielle et l'hydrolat ainsi que l'AA sont données dans la fig. 3-2.

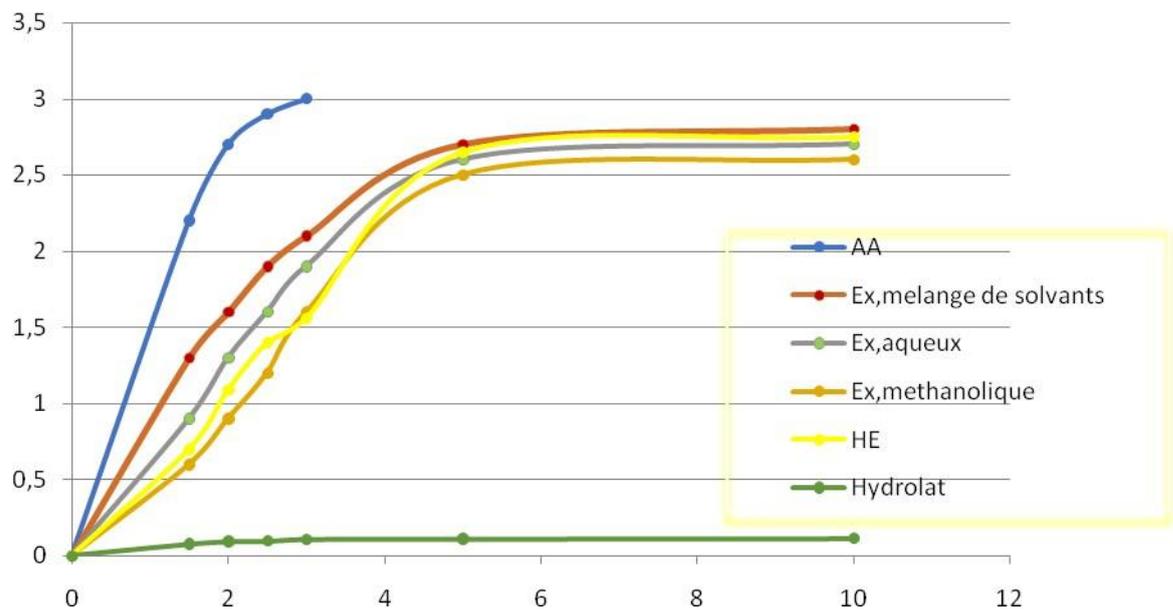


Fig. 3-2 : Courbes d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP

➤ Discussion

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP (Fig.3-2) à une concentration $C = 0,5$ mg/mL montrent que l'extrait de mélange de solvant présente une densité optique égale à 2,7 qui sont

légèrement supérieure à celle de l'huile essentielle (2,67). Celles de l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et de l'hydrolat sont respectivement (2,6, 2,5 et 0,11). Toutes des densités optiques relevées sont inférieurs à la densité optique de la référence AA qui est égale à 3. Ainsi, le classement de la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique et les différentes substances étudiées est dans l'ordre décroissant suivant :

Acide ascorbique > l'extrait de mélange de solvant > l'huile essentielle > extrait aqueux et méthanolique > l'hydrolat.

2.3. Activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits et l'huile essentielle du clou de girofle est évaluée sur la bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et la levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

Ces tests sont basés sur la mesure des diamètres des zones inhibitrices des extraits et d'huile essentielle de clou de girofle (Medfouni et al, 2018).

Après 24 heures d'incubation, nous avons mesuré le diamètre d'inhibition autour de chaque disque, à l'aide d'une règle (en millimètre) comme le montre la Fig. 3-3 et la Fig. 3-4. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 3-4.

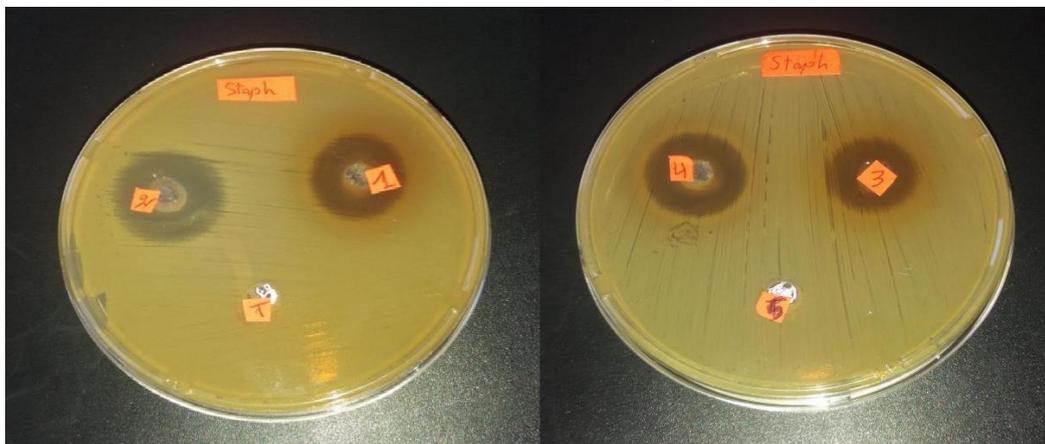


Fig. 3-3 : Activité antibactériennes des différents extraits de clou de girofle sur *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

(1): extrait de mélange de solvants, (2) : HE, (3) : extrait aqueux, (4) : extrait méthanolique et (5) : Hydrolat, (T) témoin.

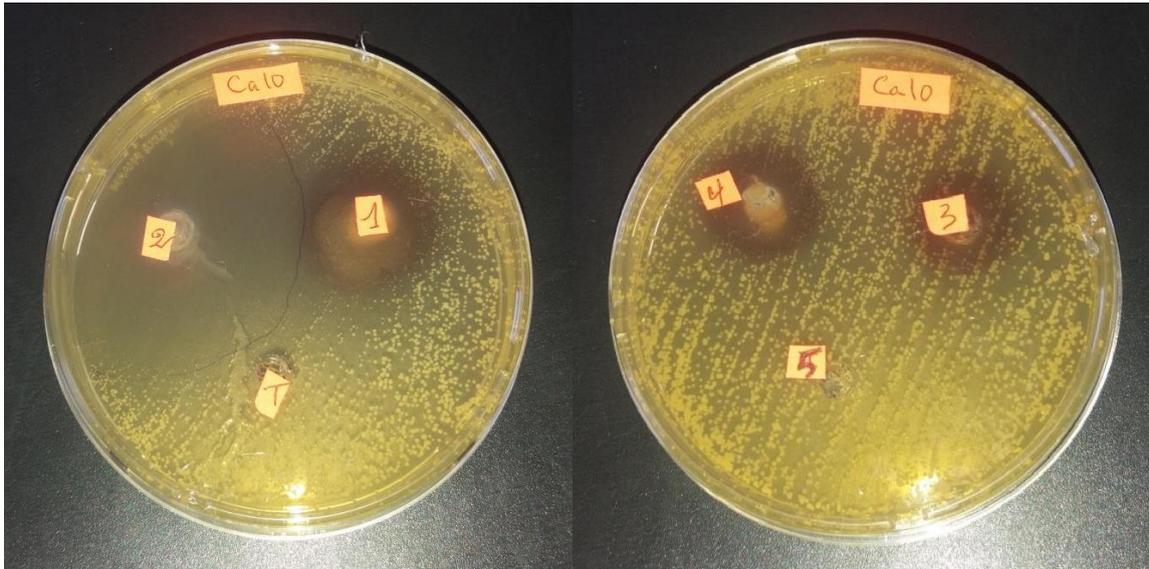


Fig. 3-4 : Activité antimicrobienne de différentes substances extraites de clou de girofle sur *Candida albicans* ATCC 10231.
 (1) : Extrait mélange solvants, (2) : HE, (3) : Extrait aqueux, (4) : Extrait méthanolique, (5) : Hydrolat et (T) témoin.

Tableau. 3-4 : Diamètres des zones d'inhibition en mm

| Germes test | Diamètres des zones d'inhibition obtenus en mm (triplicats) | |
|---|---|-------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Candida albicans</i> |
| L'extrait de mélange solvants(1) | 20 | 24 |
| Huile essentielle(2) | 24 | 55 |
| Extrait aqueux (3) | 12 | - |
| Extrait méthanoïque(4) | 15 | 17 |
| Hydrolat (5) | - | - |
| Méthanol témoin (T) | - | - |

Les numéros et la lettre entre parenthèse désignent l'abréviation de chaque substances.

L'interprétation des résultats est exprimée selon quatre niveaux d'activité en fonction du diamètre (D) de la zone d'inhibition indiqué ci-dessous (Ponce et *al*, 2003) :

- (-) souche résistante ($D < 8$ mm)
- (+) souche sensible ($8 \text{ mm} \leq D \leq 14\text{mm}$)
- (++) souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)
- (+++) extrêmement sensible ($D > 20$ mm).

➤ **Discussion****Staphylococcus aureus**

Les résultats du tableau 3-4 montre que la zone d'inhibition de l'huile essentielle (2) de clou de girofle est la plus élevée 24 mm et donc extrêmement sensible contre la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus*.

D'autre part, l'extrait de mélange de solvant (1) s'avère efficace contre *S. aureus* montrant la zone d'inhibition élevée, il montre un de diamètre d'inhibitrice égale à 20 mm de même pour l'extrait méthanolique (4) et l'extrait aqueux (3) dont les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement égales à 15 mm et 12 mm. Ces résultats sont en accord avec des résultats rapportés par Aneja et al, 2010.

Candida albicans

Pour l'activité antimicrobienne contre la levure *C. albicans*, l'huile essentielle de girofle (2) montre une excellente activité antifongique contre *C. albicans* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 55 mm. Les extraits (1) et (4) montrent également des résultats positifs très sensibles à la levure avec des diamètres des zones d'inhibition de 24 mm et 17 mm respectivement. En revanche, l'extrait aqueux (3) et l'hydrolat (5) sont des souches résistantes.

2.4. Tests phytochimiques

Ces tests phytochimique sont utilisés pour détecter la présence de classes spécifiques de composés chimiques présents dans la plante étudiée. Parmi ces composés, nous pouvons citer les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tanins. Ces tests sont qualitatifs basés sur la précipitation ou la coloration par addition de réactifs spécifiques (Medfouni et al, 2018).

Les résultats de ces tests phytochimique sont reportés dans le Tableau 3-5.

Tableau 3-5: Résultats des tests phytochimique

| | Flavonoïdes | Alcaloïdes | Tanins |
|---------------------------------------|-------------|------------|--------|
| Extrait de différents solvants | - | - | + |
| Extrait méthanolique | - | - | + |
| Extrait aqueux | - | - | + |
| Huile essentielle | - | - | - |
| Hydrolat | - | - | - |

(-) absence ; (+) présence

Les tests effectués sur les trois extraits et l'huile essentielle mettent en évidence la présence des tanins dans les trois extraits et absence des alcaloïdes ce qui est confirmé par l'étude de Medfouni et *al*, 2018. En revanche, l'absence des flavonoïdes dans l'HE peut être expliquée par le faible taux (0,4%) selon la littérature (Medfouni et *al*, 2018) qui les rend difficilement détectables.

3. Formulation des shampooings

Les dix shampooings représentés sur la fig. 3-5 sont, le témoin (T), ceux à base d'huile essentielle (H1, H2, H3), ceux à base d'extrait mélange de solvant (F1, F2, F3) et ceux à base d'extrait méthanolique (F4, F5, F6). Les pourcentages en substances actives pour chaque formulation sont donnés dans le tableau 3-6.

3.1. Analyse organoleptique

Les propriétés organoleptiques jouent un rôle important pour découvrir la qualité de produit avant l'utilisation (Grabis et *al*, 2022). En effet, les bons produits cosmétiques comme les shampooings doivent avoir une apparence sensorielle attrayante pour l'observateur.

Tableau 3-6: Formulations de shampooings

| Huile essentielle | | | Extrait mélange de solvant | | | Extrait méthanolique | | |
|-------------------|------|----|----------------------------|------|----|----------------------|------|----|
| H1 | H2 | H3 | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| 1% | 2.5% | 5% | 1% | 2.5% | 5% | 1% | 2.5% | 5% |



Fig. 3-5 : Aspect des shampooings à base d'huile essentielle et des extraits de girofle T, H1, H2, H3, F1, F2, F3, F4, F5, F6 (de gauche à droite)

Les résultats organoleptiques indiqués dans le tableau 3-7 ont été évalués sur la base d'observation et tests olfactifs de cinq personnes.

Tableau. 3-7 : Analyse organoleptique des shampooings formulés.

| | T | H1 | H2, H3 | F1, F2, F3, F4, F5, F6 |
|-------------|------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| Clarté | Opaque | Limpide | Opaque | Opaque |
| Couleur | Blanchâtre | Transparent | Blanchâtre | Marron |
| Odeur | - | Forte | Forte | Forte |
| Aspect | Visqueux | visqueux, lisse onctueux | visqueux, lisse onctueux | Huileux |
| Homogénéité | Non | Oui | Oui | Non |

Les formulations H1, H2, H3 à base d'huile essentielle à différentes concentrations étaient homogènes et limpides de forte odeur, avec un aspect très lisse de couleur transparente pour (H1), lisse onctueuse et blanche pour (H2 et H3). La formule témoin a une couleur blanchâtre et inodore, avec une texture peu visqueuse et hétérogène.

Les formulations F1, F2, F3, F4, F5 et F6 ont été négativement jugée en ce qui concerne leur texture liquide par rapport au seuil de viscosité habituelle des shampooings commerciaux standards.

3.2. Détermination de pH

Le pH des shampooings est déterminé par un pH-mètre à partir de solutions à 10 %, les résultats sont reportés dans le tableau 3-8.

Tableau. 3-8 : pH des formulations des shampooings

| | T | H1 | H2 | H2 | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ph | 4,33 | 4,21 | 4,26 | 4,20 | 3,99 | 3,98 | 3,88 | 4,24 | 3,41 | 3,76 |

D'après le tableau 3-7, le pH de toutes les formulations (H1, H2, H3, F1, F2, F3, F4, F5, F6) ainsi que le témoin T varie entre (4,33 et 3,41), Ces pH sont proches du pH de la peau qui est entre 4 à 6, Toutes les formulations ont un pH proche du pH de la barre standard pour les shampooings commerciaux (pH = 5) (AlQuadeib et al, 2018).

3.3. Activité antioxydante des shampoings

L'activité antioxydante des shampoings a été évaluée également par deux méthodes DPPH et FRAP,

3.3.1. Résultats du test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des dix shampoings ainsi que le standard acide ascorbique a été évaluée par la méthode de DPPH. Cette méthode consiste à mesurer la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde de 515 nm, Initialement, le radical DPPH est violet, mais il devient jaune lorsque son électron célibataire s'apparie pour former DPPH-H.

Tableau 3-9 : Pouvoir antioxydant des shampoings déterminé par la méthode DPPH,

| Echantillon | | Activité antioxydante | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------|------|-------|-------|
| Témoin | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 53,3 | 26,3 | 13,3 | 10,26 | 5,6 |
| H1 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 64,6 | 42,3 | 34,1 | 29,63 | 25,3 |
| H2 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 89,9 | 61,2 | 50,4 | 43,17 | 39,1 |
| H3 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 89,3 | 65,4 | 55,4 | 50,1 | 46,2 |
| F1 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 72,2 | 38,9 | 26,9 | 20,9 | 18,3 |
| F2 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 80,1 | 41,2 | 25,4 | 13,8 | 10,5 |
| F3 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 94,8 | 51,2 | 36,3 | 26,3 | 20,1 |
| F4 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 65,5 | 34,1 | 21,6 | 17,3 | 13,9 |
| F5 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 53,3 | 26,3 | 13,3 | 10,26 | 5,6 |
| F6 | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,2 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 70,3 | 49,3 | 41,5 | 36,7 | 34,2 |
| Acide Ascorbique | Concentration (mg/mL) | 1 | 0,5 | 0,2 | 0,16 | 0,14 |
| | Effet du balayage sur le DPPH% | 96,34 | 70,01 | 48,6 | 43,93 | 39,02 |

Les valeurs des CI50 obtenues pour les 10 shampooings et l'acide ascorbique sont représentées sur la figure 3-6.

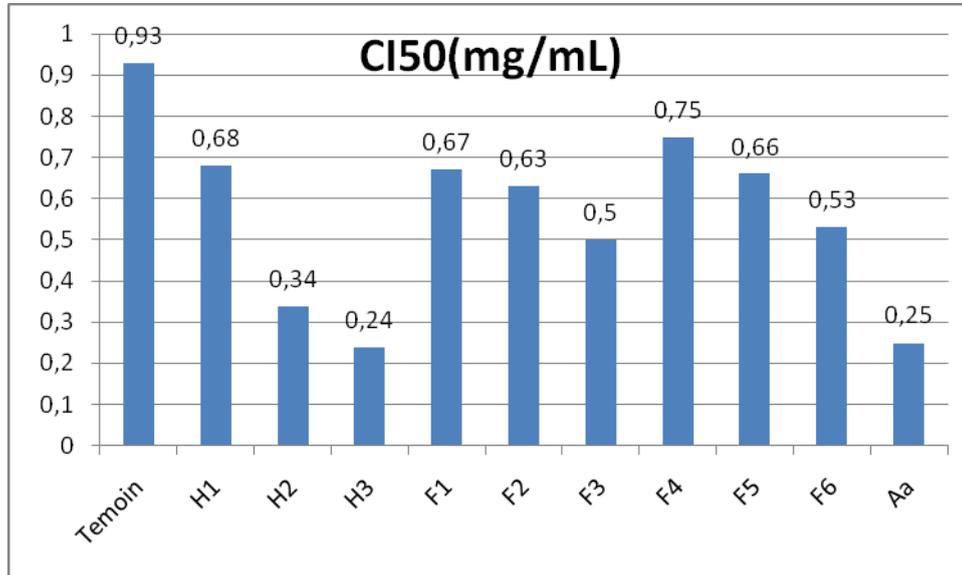


Fig. 3-6 : CI₅₀ des shampooings.

➤ Discussion

D'après les résultats du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH des shampooings présentés dans le tableau 3-9, ils se dégagent les points suivants :

- Les pourcentages de réduction de radical DPPH• des formulations à base de l'HE, H1, H2 et H3 sont dans l'ordre 42,3 %, 61,2 % et 65,4 %. Ces pourcentages sont visiblement supérieurs à ceux des formulations F1, F2, F3 à l'extrait de mélange solvant et à ceux de F4, F5 et F6 à base d'extrait méthanolique, tous pris à la même concentration de 0,5 mg/mL.
- Les shampooings étudiés montrent également que l'activité de piégeage du radical a tendance d'augmenter avec l'augmentation de la quantité de la substance active introduite dans les formulations. En effet, les formulations à 5 % de l'HE (H3), et d'extraits (F3, F6) ont un pouvoir d'inhibition plus élevé par rapport à leurs homologues formulés à 1% et 2,5 % en substance active de clou de girofle.

- Un pouvoir d'inhibition du radical avoisinant les 70 % ou 90 % est signalé pour H2 et H3 (89,9 %), F1 (72,2 %), F2 (80,1 %), F3 (94,8 %) et F6 (70,3 %) exigeant l'emploi d'une concentration de l'ordre de 1mg/mL.
- D'après la figure 3-6, on remarque que H3 qui contient 5% de l'huile essentielle a un grand pouvoir antioxydant avec une CI50 égale à 0,24 mg/mL.
- Les valeurs de CI₅₀ sont inversement proportionnelles avec le pourcentage de l'HE ou l'extrait de clou de girofle dans les shampooings.
- Toute les CI₅₀ des formulations à base de clou de girofle sont inférieures à celle du témoin (0,93 mg/mL) d'où l'intérêt et l'avantage d'ajouter l'extrait ou HE de clou de girofle.

3.3.2. Résultats du test de la réduction de fer : FRAP

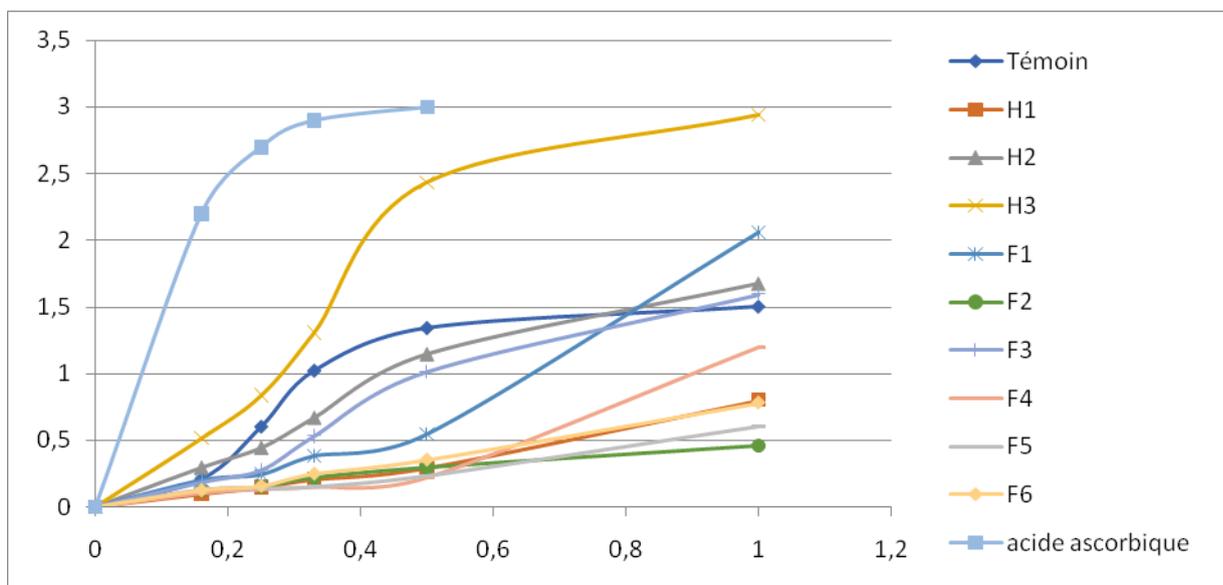


Fig. 3-7 : Courbes d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP pour les shampooings

Les courbes du Fig. 3-7 nous montrent que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des shampooings, En outre, à une concentration de 1mg/mL le shampooing H3 (5% d'HE) présente la densité optique la plus élevée proche de 3 et qui est satisfaisante à comparer avec l'acide ascorbique. En revanche, pour la même concentration de 1mg/mL, la densité optique de F1 (1% extrait mélange solvants) est égale à 2 alors que pour les autres formulations elle est inférieure.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Cette étude se concentre sur l'analyse des extraits obtenus après macération et infusion, et de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle).

Le meilleur rendement (30%) a été obtenu par la méthode d'extraction dans le mélange de solvants. D'autre part l'hydrodistillation de clou de girofle a permis d'obtenir un rendement de 3,4 % en HE. Cette faible quantité s'explique par la perte d'huile dans la phase aqueuse de l'hydrolat. Néanmoins, ce résultat est proche des normes établies par l'Association Française de Normalisation.

Nous avons révélé la présence de métabolites secondaires dans notre plante, en particulier la présence des tannins dans les trois extraits ; aqueux, méthanolique et mélange de solvant, de clou de girofle.

L'activité antioxydante de clou de girofle a été réalisée à l'aide des méthodes de réduction DPPH et FRAP. L'huile essentielle du clou de girofle a démontré le plus fort pouvoir antioxydant par rapport aux extraits avec une CI_{50} de 0,21 mg/mL. Néanmoins, l'activité antioxydante de ces extraits reste intéressante en particulier l'extrait aqueux qui donne une CI_{50} de 0,26 mg/L.

Par ailleurs, l'huile essentielle étudiée s'est révélée extrêmement sensible à la souche de bactérie *Staphylococcus Aureus* ATCC 43300 et à la souche de levure *Candida Albicans* ATCC 10231. De même une sensibilité moyenne aux deux souches a été enregistrée aussi pour les extraits.

Ces derniers (HE et les extraits) ont été utilisés dans la formulation de shampooings destinés à un usage régulier, et ce, à différentes doses.

Ainsi, neuf formulations de shampooings et un témoin ont été réalisés à base d'HE et les extraits représentant le principe actif de clou de girofle.

Les résultats des propriétés organoleptiques, physicochimiques et fonctionnelles des différentes formules, contenant de l'HE et des extraits, ont montré un avantage concret pour les formules H1, H2 et H3 ayant le pourcentage respectif à 1%, 2,5% et 5% en HE. Les shampooings H1, H2, H3 ont été très appréciés par les testeurs en raison de la couleur transparente pour le premier et blanchâtre pour les deux autres, de leur odeur attrayante de clou de girofle, de leur onctuosité et d'homogénéité, ainsi que de leur texture lisse et visqueuse agréable au toucher. De plus, la formule s'est avérée stable en présence de l'HE.

L'activité antioxydante de ces shampooings a été également étudiée en utilisant les méthodes de réduction DPPH et FRAP.

Ces deux techniques ont permis de mettre en évidence l'activité antioxydante des shampooings contenant l'HE ou les extraits de clou de girofle. Les formulations à base de l'HE (H1, H2 et H3) ont révélé un meilleur pourcentage de réduction de radical DPPH pour des concentrations faibles de l'ordre de 0,5 mg/mL par rapport à ceux formulés avec les extraits. Les shampooings réalisés ont montré également que l'activité de piégeage du radical a tendance d'augmenter avec l'augmentation de la quantité de la substance active introduite dans les formulations à savoir ceux à 5 % sont meilleurs à ceux à 2,5 % ou 1 %. Un pouvoir d'inhibition du radical avoisinant les 70 % ou 90 % a été enregistré pour H2 et H3 (89,9 %), F1 (72,2 %), F2 (80,1 %), F3 (94,8 %) et F6 (70,3 %) exigeant l'emploi d'une concentration de l'ordre de 1mg/mL. Les valeurs de CI_{50} obtenues ont montré, d'une part, une relation inversement proportionnelle avec le pourcentage l'HE ou l'extrait dans les shampooings. D'autre part, toutes les CI_{50} des formulations à base de clou de girofle ont été inférieures à celle du témoin d'où l'intérêt et l'avantage d'ajouter l'extrait ou HE de clou de girofle dans ces produits cosmétiques.

Étant donné que la plante étudiée présente des propriétés particulièrement intéressantes qui méritent d'être exploitées, et compte tenu des résultats prometteurs que nous avons obtenus, nous suggérons les perspectives suivantes :

- Elargir l'étude antibactérienne sur une grande variété de souches de bactérie et fongique.
- Étude de la stabilité et de la sécurité des composés actifs du clou de girofle dans différentes formulations, ainsi que sur leur innocuité et leur sécurité d'utilisation à long terme.
- Développement de produits dérivés tels que des lotions capillaires, des traitements pour le cuir chevelu ou des produits de soins capillaires spécifiques.

REFERENCES

REFERENCES

- Achiri, R. (2022).** Recherche de nouvelles substances présentes dans quelques espèces de la famille des Astéracées. Thèse de doctorat en chimie. Université de Tlemcen.
- Adli, D. (2015).** Effets prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) chez les rats wistar en croissance intoxiqués au plomb et au manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale, Université d'Oran.
- AFNOR (Association française de normalisation). (2000).** Recueil des normes française « huile essentielles » Monographies relatives aux huiles essentielles .AFNOR, Paris.
- Aghel, N. Moghimipour, E. Azadeh Raies, D. (2010).** Formulation of a herbal shampoo using total saponins of *Acanthophyllum squarrosum*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 6(3): 167-172.
- Al Badi, K. Khan, S. (2014).** Formulation, evaluation and comparison of the herbal shampoo with the commercial shampoos. Béni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 3(4) : 301-305.
- AlQuadeib, B. Eltahir, E. Banafa, R. Al-Hadhairi, L. (2018).** Pharmaceutical evaluation of different shampoo brands in local Saudi market. Saudi pharmaceutical journal 26(1): 98-106.
- Aneja, K. Joshi, R. (2010).** Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* and its bud oil against dental cares causing microorganisms. Ethnobotanical Leaflets 14(3): 960-975.
- Balouiri, M. Sadiki, M. Ibnsouda, S. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6(3): 71-79.
- Banouh, R. Azzouz, A. (2019).** Evaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et activité antioxydante de l'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*). Université Bouira.
- Barbelet, S. (2015).** Le giroflier: historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Université de Lorraine.
- Benhamidat, L. (2022).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire de trois plantes de la famille des Astéracées : Investigation phytochimique et Activités biologiques. Thèse de doctorat en chimie. Université de Tlemcen
- Boucherit, A. Hamadi, I. (2016).** Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du clou de girofle sur les bactéries responsables des caries dentaires et comparaison de son effet avec celui du Fluor, Université de Jijel.
- Bounjoua, S. (2014).** Cosmétologie capillaire Enquête sur les préparations cosmétiques traditionnelles au Maroc rabat-Salé. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V – Souissi.

- Bouzaa, F. Zid, H. Hariza, E (2022).** Etude des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de la plante *Syzygium aromaticum*. Université de Constantine.
- Chagra, K. (2019).** Etude les propriétés physico-chimiques et biologique de clou du girofle (*Syzygium aromaticum* (L)). Université de Biskra.
- CLSI, (2015).** Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—12th ed. M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- CLSI. (2009).** Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document M44-A2. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Diego Francisco C.R, Claudia Regina Fernande S and Wanderley Pereira O. (2014).** Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.4(2): 90-96.
- EL-Haoud, H. Boufellous, M. BERRAN, A. Tazougart, H. Bengueddour, R. (2018).** SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: MENTHA SPICATA L. *Am. J. innov. res. appl. sci.* 7(4): 226-233.
- Emmanuelle, C. (2013).** Les shampoings et les principales pathologies capillaires à l'officine. Université de Limoges.
- Fourcin C, Penot E, Michel 1. Danthu P, Jahiel M. (2015).** Contribution du giroflier à la sécurité alimentaire des ménages agricoles dans la région de Fénériver-Est, Madagascar.
- Gattefossé, J. (1921). Les végétaux aromatiques de Madagascar. *Agronomie tropicale* 46(5) :113-121.
- Ghedira, K., Goetz, P., and Jeune, R. (2010).** "Syzygium Aromaticum (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier." *Phytothérapie* 8(1):37-43.
- Goetz, P. Ghedira, K. (2012).** *Syzygium aromaticum*(L.) Merr. & Perry (Myrtaceae): giroflier. *Phytothérapie anti-infectieuse*, Springer 12(3): 281-292.
- Grabis, S. Halai, N. (2022).** Formulation et caractérisation d'un shampoing à base d'un extrait des cladodes d'*Opuntia ficus indica* de la région de Tissemsilt. Université de Tissemsilt.
- Jayaprakash G. Singh R. Sakariah K. (2001).** Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry* 73(3): 285-290.

- Kumar, A. Mali, R. (2010).** Evaluation of prepared shampoo formulations and to compare formulated shampoo with marketed shampoos. *Evaluation* 3(1): 120-126.
- Lobstein, A. Couic-Marinier, F. Barbelet, S. (2017).** Huile essentielle de Clou de girofle. *Actualités Pharmaceutiques* 56(569): 59-61.
- Mainkar, A. Jolly, C. (2001).** Formulation of naturel shampoos. *International journal of cosmetic science* 23(1): 59-62.
- Medfouni, R. Hafsi, N. Mazouz, W. (2018).** Contribution à l'étude phytochimique et les activités biologiques d'une plante médicinale *Syzygium aromaticum*. Université *OUM EL BOUAGHI*
- Nait Achour, K. (2012).** *Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'encalyptus poussant dans la région de Tizi Ouzou*. Thèse de doctorat en chimie. Université Tizi Ouzou.
- Penot, E. Richard, A. Levasseur, S. Michel, I. Anjanahary, Ra. Danthu, P. (2021).** Les systèmes girofliers à Sainte-Marie, Madagascar: un héritage historique en pleine mutation. SFER 2020.
- Ponce, A. Fritz, R. Del Valle, C. Roura, S. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food science and Technology* 36(7): 679-684.
- Razafimamonjison, G. R. Boulanger. (2016).** Pour l'optimisation de la qualité des produits du giroflier de Madagascar (clous et huiles essentielles): étude des facteurs de leurs variabilités.
- Rodríguez-Tudela JL. Cuenca-Estrella M. Díaz-Guerra TM. Mellado E. (2001).** Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* 39(7):2513–2517.
- Vârban D. Duda M. Vârban R. Muntean S. (2009).** Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. Culture. *Bulletin UASVM Agriculture*. 66(2) : 225- 229.
- Soltani, A. Saadia, D. (2021).** Evaluation de l'activité antioxydante de quelques huiles essentielles en vue de leur utilisation comme agent naturel conservateur et aromatique, Université de M'sila.
- Zouhri, A. Bouddine, T. El-mernissi, Y. El-Akhal, J. Hajji, L. Amhamdi, H. (2022).** *Syzygium aromaticum*: Traditional uses, antioxidant, anti-inflammatory activities and photo-protective properties. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 8(3): 43-56.

